

Untersuchung des Bmp-Signalweges während der Muskelregeneration

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Melanie Friedrichs

aus Luxemburg

August 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Vortkamp
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Winterhager
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. B. Sures

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	viii
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Muskulatur.....	1
1.1.1 Aufbau der Skelettmuskulatur und Muskelfaser	1
1.1.2 Die Entstehung des Muskels (Myogenese).....	2
1.2 Die Regeneration der Muskulatur.....	3
1.2.1 Was ist Regeneration?	3
1.2.2 Satellitenzellen regenerieren den Muskel nach einer Verletzung	4
1.2.3 Transkriptionelle Kontrolle der Regeneration	5
1.2.4 Regulation der Regeneration durch extrinsische Faktoren.....	8
1.2.5 Die Bedeutung von Satellitenzellen bei der Pathologie primärer Myopathien.....	11
1.2.6 in vitro und in vivo Regenerationsmodelle.....	12
1.3 Der Bmp-Signalweg.....	13
1.3.1 Der nicht-kanonische Bmp-Signalweg.....	15
1.3.2 Inhibitoren des Bmp-Signalwegs	15
1.3.3 Die Rolle von Bmp-Signalen während der Myogenese.....	16
2. Zielsetzung.....	17
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Chemikalien.....	19
3.1.2 Enzyme.....	19
3.1.3 Zellkulturmedien, -seren und -zusätze.....	20
3.1.4 Rekombinante Proteine.....	20
3.1.5 Antikörper.....	20
3.1.6 verwendete Oligonukleotide.....	21
3.1.7 Geräte und Software.....	21
3.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	22
3.2 Zellbiologische Methoden.....	22
3.2.1 Kultivierung von C2C12 Zellen.....	22
3.2.2 Präparation von Muskeleinzelfasern.....	23
3.2.3 Myoblastenkulturen.....	25
3.2.4 Nachweis von Alkalischer Phosphatase in Zellkulturen.....	26

3.3 Histologie	27
3.3.1 Einbetten von Muskelgewebe für Gefrierschnitte	27
3.3.2 Anfertigung von Gefrierschnitten	27
3.3.3 Histologische Färbung von Gewebeschnitten mit Toluidinblau	27
3.4 Immunchemische Methoden	28
3.4.1 Vorbereiten der Gewebeschnitte für die Immunfluoreszenz	28
3.4.2 Immunfluoreszenz	28
3.5 Molekularbiologische Methoden	30
3.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben	30
3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
3.5.3 Synthese von cDNA	31
3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.5.5 Realtime-quantitative PCR	32
3.5.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	33
3.6 Tierexperimenteller Ansatz	33
3.6.1 Verwendeter Mausstamm	33
3.6.2 Organentnahme	34
3.6.3 Muskeltrauma	34
3.7 Bilddokumentation und Datenanalyse	34
3.7.1 Bildaufnahme	34
3.7.2 Quantifizierung von Zellen und Fluoreszenz-Signalen	34
3.7.3 Statistische Auswertung	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Analyse der Differenzierung von C2C12 Zellen	36
4.1.1 Bmp-Signale induzieren die Transdifferenzierung in Osteoblasten von C2C12 Zellen	36
4.1.2 Die Inhibition von Bmp-Signalen induziert die terminale Muskeldifferenzierung von C2C12 Zellen	37
4.1.3 Bmp-Signale sind ausreichend um den programmierten Zelltod während der Differenzierung von C2C12 Zellen zu verhindern	39
4.2 Analyse des Bmp-Signalwegs in primären Satellitenzellen	40
4.2.1 Primäre Satellitenzellen reagieren auf Bmp-Signale in ex vivo Kulturen	40
4.2.2 Direkter Effekt von Bmp-Signalen auf Satellitenzellen	44
4.2.3 Aufrechterhaltung der Pax7 Expression nach Stimulation mit Bmp7	46
4.2.4 Bmp-Signale induzieren keine Transdifferenzierung in Myoblasten	46
4.2.4.a Etablierung reiner Satellitenzellkulturen	46

4.2.4.b Bmp-Signale induzieren keine Transdifferenzierung von primären Satellitenzellen in Osteoblasten.....	47
4.2.5 Die Inhibition von Bmp-Signalen induziert die terminale Differenzierung von Myoblasten.....	48
4.2.6 Sekundäreffekte beeinflussen die Proliferation in Myoblastenkulturen.....	50
4.2.7 Die Inhibition von Bmp-Signalen induziert den Austritt aus dem Zellzyklus.....	53
4.2.8 Fusionierte Myoblasten zeigen eine abgeschwächte Reaktivität gegenüber Bmp-Signalen.....	55
4.2.9 Expression eines Bmp-Inhibitors in kultivierten Satellitenzellen.....	55
4.3 in vivo Funktion von Bmp-Signalen während der Muskelregeneration.....	57
5. Diskussion.....	63
5.1 Bmp-Signale sind mit der myogenen Differenzierung vereinbar.....	63
5.2 Bmps regulieren die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten.....	65
5.2.1 Bmps regulieren die Expression von Pax7	65
5.2.2 Bmp-Signale induzieren die Zellzyklus-Progression und inhibieren die terminale Differenzierung von Myoblasten.....	65
5.2.3 Bmp-Signale inhibieren die Expression und Aktivität von MRFs.....	67
5.2.4 Sekundäreffekte beeinflussen das Verhalten primärer Myoblasten in Kultur	67
5.2.5 Die terminale Differenzierung von Myoblasten wird in Abwesenheit von Bmp-Signalen beschleunigt.....	68
5.3 Expression der Bmp-Signalweg-Komponenten.....	68
5.4 Klinische Relevanz.....	71
5.5 Schlussfolgerung und Modell zur Rolle der Bmps während der Regeneration..	72
6. Zusammenfassung.....	74
7. Abstract.....	76
8. Literaturverzeichnis.....	77
Danksagung.....	90
Publikationen.....	91
Lebenslauf.....	92
Erklärungen.....	93

Abkürzungsverzeichnis

BCIP	5-Brom-4-chlor-3indoxylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
E	Embryonalstadium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
Hox	Homöobox
k (Präfix)	kilo (10 ³)
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	Molar
m (Präfix)	milli (10 ⁻³)
μ (Präfix)	mikro (10 ⁻⁶)
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
n (Präfix)	nano (10 ⁻⁶)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	<i>Realtime</i> quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	reverse Transkription-PCR
t	Zeit (<i>time</i>)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	Unit
V	Volt
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen
x	fach

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des adulten Muskels.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Regenerationsprozesses.....	5
Abbildung 3: Die Regulation der Regeneration durch extrinsische Signalmoleküle.....	10
Abbildung 4: Der Bmp-Signalweg.....	14
Abbildung 5: Bmp-Signale induzieren die Transdifferenzierung von C2C12 Zellen in Osteoblasten.....	37
Abbildung 6: Bmp-Signale inhibieren die terminale Differenzierung von C2C12 Zellen.....	38
Abbildung 7: Bmp-Signale verhindern Apoptose während der Differenzierung von C2C12 Zellen.....	40
Abbildung 8: Zeitabhängige Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren in kultivierten Satellitenzellen.....	42
Abbildung 9: Satellitenzellen reagieren auf Bmp-Signale.....	43
Abbildung 10: Satellitenzellen reagieren direkt auf Bmp-Signale.....	45
Abbildung 11: Satellitenzellen migrieren auf einem Kultursubstrat von der Faser weg.....	46
Abbildung 12: Primäre Myoblasten zeigen keine Transdifferenzierung in Osteoblasten nach Bmp7-Behandlung.....	47
Abbildung 13: Bmp-Signale regulieren die Differenzierung von primären Myoblasten.....	49
Abbildung 14: Veränderte Proliferationsraten nach BMP-Behandlung.....	52
Abbildung 15: Die Inhibition von Bmp-Signalen induziert den Austritt aus dem Zellzyklus.....	54
Abbildung 16: Verlust der Reaktivität auf Bmp-Signale während der späten Differenzierung	55
Abbildung 17: Expression des Bmp-Inhibitors Chordin in kultivierten Einzelfasern.....	56
Abbildung 18: Analyse des Regenerationsprozesses nach Muskeltrauma.....	58
Abbildung 19: MyoD und p-Smad sind in unverletzter Muskulatur nicht detektierbar	59
Abbildung 20: Aktive Bmp-Signale während der Muskelregeneration.....	60

Abbildung 21: Während der späten Regeneration sind Bmp-Signale deutlich reduziert.....	61
Abbildung 22: Die Expression des Bmp-Inhibitors Chordin ist während der Regeneration reguliert.....	62
Abbildung 23: Model zur Funktion des Bmp-Signalwegs während der Muskelregeneration.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herkunftsorganismus und Verdünnung der verwendeten Antikörper

1. Einleitung

1.1 Die Muskulatur

Die Muskulatur der Wirbeltiere ist ein komplexes Organsystem, welches verschiedene Funktionen erfüllt. Alle Formen von Muskeln sind zur Kontraktion bzw. zur Krafterzeugung befähigt. Muskeln regulieren auf diese Weise eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Es gibt drei Arten spezialisierten Muskelgewebes: die Skelettmuskulatur, die glatte Muskulatur und die Herzmuskulatur. Die grundlegenden Prozesse, die zur Kontraktion des Muskels führen sind in allen Arten der Muskulatur gleich. Die glatte Muskulatur der Eingeweide und die Herzmuskulatur unterscheiden sich jedoch deutlich im Aufbau von der Skelettmuskulatur. So zeigen sowohl die glatte Muskulatur als auch die Herzmuskulatur einen Aufbau aus Einzelzellen. In der Herzmuskulatur liegt ebenso wie in der Skelettmuskulatur eine Querstreifung vor, die durch die regelmäßige Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente zustande kommt. Dies ermöglicht die schnelle Kontraktion des Muskels. Aktin- und Myosinfilamente gleiten dabei ineinander, wodurch der Muskel verkürzt wird.

1.1.1 Aufbau der Skelettmuskulatur und Muskelfaser

Die Skelettmuskulatur ermöglicht gemeinsam mit dem Knochenskelett die aufrechte Haltung und Bewegung. Eine überlebenswichtige Aufgabe kommt der Muskulatur bei der Regulation der Körperhomöostase und der Atmung zuteil.

Die funktionelle Untereinheit des Muskels ist die Muskelfaser (Abbildung 1). 10-30 einzelne Fasern werden in Muskelbündeln, die von einer kollagenhaltigen Bindegewebsschicht (Perimysium) umgeben sind, zusammengefasst. Die Muskelbündel eines Muskels wiederum werden durch das Epimysium zu einer Einheit, dem Muskel, zusammengefasst.

Muskelfasern entstehen durch die Fusion von Vorläuferzellen (Myoblasten) zu einem Synzytium (Bischoff, 1986b; U. R. Königsberg et al., 1975; Lipton und Schultz, 1979). Die Zellkerne der Muskelfaser (Myonuklei) befinden sich direkt unterhalb der Zellmembran (Sarkolemm), während das Zellinnere von Myofibrillen, die die

kontraktilen Filamente enthalten, ausgefüllt ist. Jede einzelne Muskelfaser wird von einer Basallamina umgeben. Zwischen dem Sarkolemm und der Basallamina befinden sich die sogenannten Satellitenzellen.

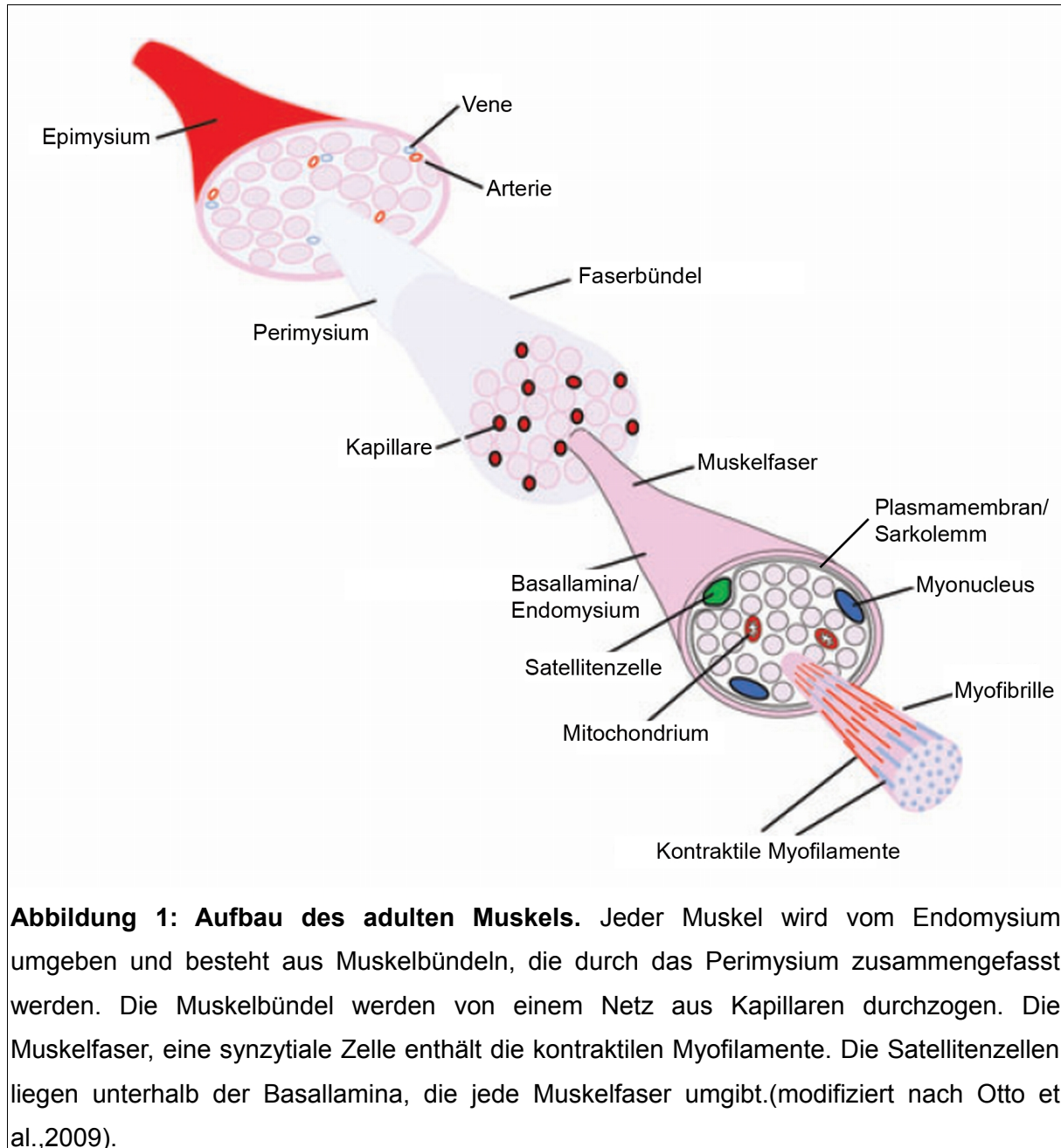


Abbildung 1: Aufbau des adulten Muskels. Jeder Muskel wird vom Endomysium umgeben und besteht aus Muskelbündeln, die durch das Perimysium zusammengefasst werden. Die Muskelbündel werden von einem Netz aus Kapillaren durchzogen. Die Muskelfaser, eine synzytiale Zelle enthält die kontraktilen Myofilamente. Die Satellitenzellen liegen unterhalb der Basallamina, die jede Muskelfaser umgibt.(modifiziert nach Otto et al.,2009).

1.1.2 Die Entstehung des Muskels (Myogenese)

Die quergestreifte Muskulatur der Gliedmaßen, des Rumpfes, der Zunge und des Nackens entsteht während der Embryonalentwicklung aus den Somiten (Stockdale et al., 2000). Aus diesen transienten, mesodermalen Strukturen entsteht dorsal das

Dermomyotom, während der ventrale Anteil das Sklerotom bildet, aus dem sich das Axialskelett und die Rippen entwickeln (Brent et al., 2003; Tallquist et al., 2000). Aus dem Dermomyotom, einer epithelialen Struktur, entstehen im Verlauf der Embryonalentwicklung neben der Muskulatur die Dermis (Christ et al., 1983). Im Verlauf der Myogenese delaminieren Zellen von den Seiten des Dermomyotoms und unterwandern es. Dadurch wird das Myotom gebildet, woraus die Muskulatur des Rumpfes entsteht (Denetclaw et al., 1997; Kahane et al., 1998; Williams und Ordahl, 1997). Die embryonalen Myoblasten, die die Muskulatur der Gliedmaßen bilden, delaminieren vom Dermomyotom und migrieren in die Gliedmaßenknospen, wo sie die Anlage des Muskels, die Primärfasern, bilden (Christ et al., 1977). Im weiteren Verlauf, während der sekundären Myogenese, werden dann fötale Myoblasten rekrutiert, die sowohl mit den Primärfasern fusionieren als auch neue Muskelfasern bilden (Stockdale, 1992; Biressi et al., 2007).

1.2 Die Regeneration der Muskulatur

Charakteristische Eigenschaften der Muskulatur sind ein durch Training stimuliertes Wachstum sowie die Regenerationsfähigkeit nach einer Verletzung. Diese Eigenschaften sind auf die Präsenz von Stammzellen in der adulten Muskulatur zurückzuführen (Mauro, 1961). Dabei konnten unterschiedliche Stammzellen identifiziert werden, die das Potential aufweisen, die Muskulatur zu regenerieren, wie Perizyten, Mesangioblasten, Hämatopoetische Stammzellen sowie die Zellen der sogenannten Seitenpopulation der Muskulatur. Alle zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Fusion in Myotuben (Crisan et al., 2008; Dellavalle et al., 2007; Ferrari et al., 1998; Minasi et al., 2002). Auch wenn verschiedene Stammzellen in der Lage sind, die Muskulatur zu regenerieren, haben sich die Satellitenzellen als Hauptakteure während dieses Prozesses herausgestellt (Collins et al., 2005).

1.2.1 Was ist Regeneration?

Wird durch eine Verletzung des Muskels Regeneration induziert, kommt es zunächst zu einer Immunreaktion und der Invasion von Leukozyten in die betroffene Region des Muskels. Die inflammatorischen Signale, die durch ein Trauma induziert wurden, führen zur Degeneration der betroffenen Muskelfasern, die im weiteren Verlauf der Regeneration ersetzt bzw. repariert werden müssen (Tidball, 2005). Neben der

Wiederherstellung funktioneller Muskelfasern müssen während der Regeneration auch betroffene Blutgefäße sowie die neuromuskuläre Endplatte erneuert werden.

Die Wiederherstellung funktioneller Muskelfasern erfordert die *de novo* Produktion von Muskelgewebe. Verantwortlich dafür sind die Satellitenzellen, die während ihrer Aktivität Myoblasten hervorbringen, die in neue Muskelfasern fusionieren oder beschädigte Fasern reparieren (Snow, 1977). Die *de novo* Formation von Muskelfasern rekapituliert so in großen Teilen die embryonale Myogenese.

1.2.2 Satellitenzellen regenerieren den Muskel nach einer Verletzung

Der Name "Satellitenzellen" lässt sich auf die Position dieser adulten Muskelstammzellen zurückführen: sie befinden sich in der Peripherie jeder Muskelfaser unterhalb der Basallamina (Abbildung 1). Sie kommen spezifisch in der Skelettmuskulatur vor und befinden sich in der unverletzten Muskulatur in einem mitotisch inaktiven Ruhezustand (Schultz et al., 1978).

Eine Übersicht über die verschiedenen Stadien, die Satellitenzellen während der Regeneration durchlaufen ist in Abbildung 2 dargestellt. Wird der Regenerationsprozess durch extrinsische Signale induziert, kommt es zur Aktivierung der Satellitenzellen aus dem Ruhezustand und zum Eintritt in den Zellzyklus (Bischoff, 1986a). Die aktivierten Satellitenzellen beginnen dann zu proliferieren und bringen Myoblasten hervor, die wiederum selbst aktiv proliferieren (Bischoff, 1975). Wenn Myoblasten in ausreichender Anzahl vorhanden sind, beginnen diese zu differenzieren. Nach dem Austritt aus dem Zellzyklus können die Myoblasten zu Myotuben fusionieren, einer Vorstufe der Muskelfaser, die durch die zentrale Position der Myonuklei charakterisiert wird. Die Expression von Strukturproteinen wie z.B. Myosin kann zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden. Während der Reifung der Muskelfaser kommt es zur Bildung der kontraktilen Elemente und die Myonuklei erhalten ihre Position unterhalb des Sarkolemm. Alternativ dazu können die Myoblasten während der Differenzierung auch mit beschädigten Muskelfasern fusionieren und so der Muskelfaser neue Myonuklei liefern (Moss und Leblond, 1971).

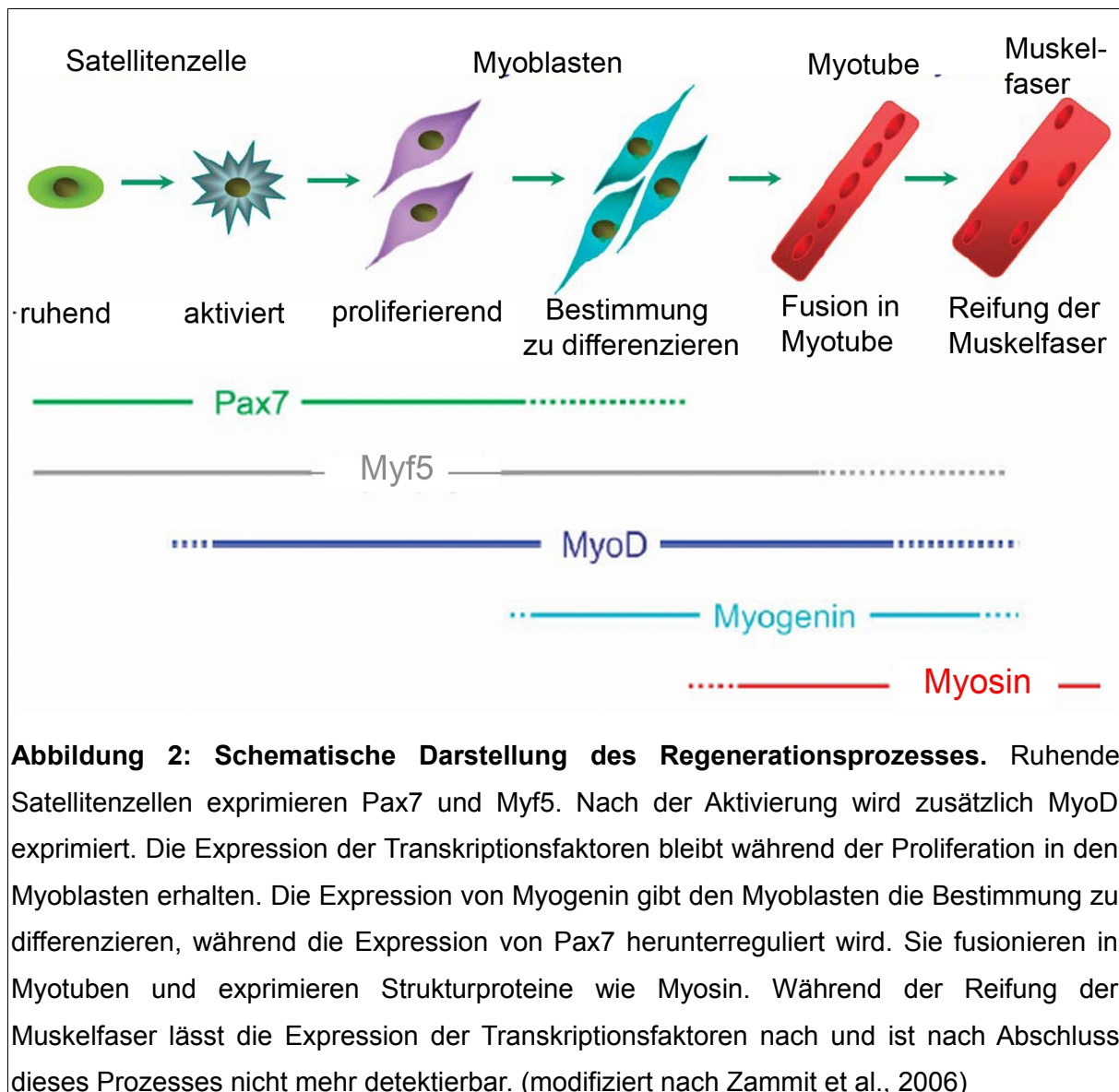


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Regenerationsprozesses. Ruhende Satellitenzellen exprimieren Pax7 und Myf5. Nach der Aktivierung wird zusätzlich MyoD exprimiert. Die Expression der Transkriptionsfaktoren bleibt während der Proliferation in den Myoblasten erhalten. Die Expression von Myogenin gibt den Myoblasten die Bestimmung zu differenzieren, während die Expression von Pax7 herunterreguliert wird. Sie fusionieren in Myotuben und exprimieren Strukturproteine wie Myosin. Während der Reifung der Muskelfaser lässt die Expression der Transkriptionsfaktoren nach und ist nach Abschluss dieses Prozesses nicht mehr detektierbar. (modifiziert nach Zammit et al., 2006)

1.2.3 Transkriptionelle Kontrolle der Regeneration

Die unterschiedlichen Schritte während der satellitenzellvermittelten Regeneration werden intrinsisch durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert. Dabei sind paired-box Transkriptionsfaktoren und Mitglieder der sogenannten MRFs (myogenic regulatory factors) die wichtigsten Vertreter (Abbildung 2).

Die Expression des *paired-box gene7* (*Pax7*) ist ein charakteristisches Merkmal von Satellitenzellen (Seale et al., 2000). Mit Hilfe dieses Transkriptionsfaktors lassen sich ruhende, aktivierte und proliferierende Satellitenzellen in der Muskulatur spezifisch nachweisen. Durch die Deletion von *Pax7* in Mäusen konnte eine essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors während der postnatalen Entwicklung des Muskels

festgestellt werden: Obwohl zum Zeitpunkt der Geburt *Pax7*-defiziente Mäuse keine offensichtliche Defekte der Muskelentwicklung aufweisen, kann ein erheblicher Defekt im postnatalen Muskelwachstum und während der Regeneration beobachtet werden (Kuang et al., 2006; P. Seale et al., 2000). So ist die Anzahl der Satellitenzellen in diesen Mäusen drastisch reduziert und die Funktionalität der verbleibenden Satellitenzellen stark eingeschränkt. Zusätzliche Reporteranalysen zeigten außerdem, dass *Pax7*-defiziente Zellen die für Satellitenzellen typischen Oberflächenproteine wie Syndecan4 und CD34 nicht exprimieren. Die *in vitro* Kultivierung dieser *Pax7*-defizienten Satellitenzellen zeigte ausserdem, dass diese keine Myoblasten hervorbringen können (Kuang et al., 2006).

Die Gruppe der MRFs umfasst die vier bHLH Transkriptionsfaktoren myf5, MyoD, myogenin und myf6. Die ektopische Expression dieser Faktoren führt in nicht-Muskelzellen zu einer Differenzierung in Myoblasten. Sie gelten daher als Determinationsfaktoren für ein myogenes Zellschicksal (Tapscott et al., 1988; Weintraub et al., 1989; Lattanzi et al., 1998; Davis et al., 1987). Alle Mitglieder der MRFs zeigen in Satellitenzellen ein zeitabhängiges Expressionsprofil (Zammit et al., 2004; Füchtbauer und Westphal, 1992; Grounds et al., 1992; Yablonka-Reuveni und Paterson, 2001; Yablonka-Reuveni et al., 1999)

Ein Großteil der Satellitenzellen exprimiert *Myf5* bereits im Ruhezustand (Beauchamp et al., 2000; Tajbakhsh et al., 1996). Nur eine kleine Fraktion der Satellitenzellen scheint diesen Transkriptionsfaktor im Ruhezustand nicht zu exprimieren (Kuang et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei den *Myf5*-positiven Satellitenzellen um vorbestimmte myogene Vorläuferzellen handelt, während die *Myf5*-negative Fraktion echte Stammzellen darstellen, die den Satellitenzell-Pool erneuern können (Kuang et al., 2007).

MyoD ist das am besten charakterisierte Mitglied der MRFs. Es wurden eine Vielzahl von posttranslationellen Modifikationen ebenso wie Interaktionspartner identifiziert, die den Prozess der Regeneration maßgeblich beeinflussen. MyoD kann in Satellitenzellen nach der Aktivierung aus dem Ruhezustand, während der Proliferation und der Differenzierung detektiert werden (Yablonka-Reuveni und Paterson, 2001; Grounds et al., 1992; Füchtbauer and Westphal, 1992). Es wird davon ausgegangen, dass die Menge an aktivem MyoD-Protein eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung spielt (L'honore et al.,

2007; Otto et al., 2009). Die Deletion von *MyoD* hat keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Muskulatur, was auf eine Redundanz mit *Myf5* zurückzuführen ist (Rudnicki et al., 1993). Während der Regeneration des adulten Muskels führt der Verlust von MyoD jedoch zu einer stark beeinträchtigten Proliferation, woraus sich eine essentielle Rolle dieses Faktors während der Proliferation ableiten lässt (Megeney et al., 1996).

Myogenin wird in adulten Myoblasten als Differenzierungsmarker verwendet, obwohl hinreichend bekannt ist, dass die Expression bereits während die Zelle noch aktiv proliferiert, auftritt (Yoshida et al., 1998). Es wird davon ausgegangen, dass Myogenin in den Zellen exprimiert wird, die dazu bestimmt sind, aus dem Zellzyklus auszutreten und terminal zu differenzieren. Darüber hinaus bleibt dieser Transkriptionsfaktor in den Myoblasten erhalten, die terminal aus dem Zellzyklus ausgetreten sind und kann noch nach der Fusion in den Myonuklei der Myotuben detektiert werden. Diese Expression wird während der Reifung der Muskelfaser herunterreguliert und ist in nicht-regenerierenden Muskelfasern nicht mehr detektierbar (Zammit et al., 2004; Füchtbauer and Westphal, 1992; Grounds et al., 1992; Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994; Yablonka-Reuveni und Paterson, 2001). Die Deletion von Myogenin führt während der Embryonalentwicklung zu schweren Defekten bei der Bildung von funktioneller Muskulatur (Nabeshima et al., 1993; Hasty et al., 1993). Die dadurch verursachte Ateminsuffizienz führt perinatal zum Tode. Im Gegensatz zu allen anderen MRFs gibt es keinen redundanten Faktor, der die Funktion von Myogenin während der Embryonalentwicklung ersetzen kann (Rawls et al., 1995). Im Gegensatz dazu zeigt sich nach postnataler Deletion kein offensichtlicher Defekt während des Wachstums und der Regeneration (Meadows et al., 2008a; Knapp et al., 2006). Auch die Kultivierung primärer Myoblasten von Myogenin-deletierten Zellen zeigt keine offensichtlichen Defekte während der Differenzierung (Meadows et al., 2008a).

Der Transkriptionsfaktor Myf6 ist das am wenigsten charakterisierte Mitglied der MRFs. Bereits während der Embryonalentwicklung wird dieser Faktor in differenziertem Muskel exprimiert, wodurch diesem Faktor eine Rolle bei der Differenzierung zugeordnet wurde (Patapoutian et al., 1995; Zhang et al., 1995; Kassam-Duchossoy et al., 2004; Braun und Arnold, 1995). Auch im adulten Muskel kann Myf6 in den Myonuklei der Muskelfaser detektiert werden (Haldar et al., 2008).

1.2.4 Regulation der Regeneration durch extrinsische Faktoren

Der Regenerationsprozess bzw. die Aktivität der Satellitenzellen wird durch extrinsische Faktoren kontrolliert. Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren konnte identifiziert werden, die während der Regeneration auf Satellitenzellen und Myoblasten wirken (Abbildung 3).

Nach Induktion eines Traumas kommt es zur Aktivierung der Satellitenzellen aus dem Ruhezustand (Snow, 1977; Moss und Leblond, 1971; Reznik, 1969). "Hepatocyte growth factor" (Hgf) hat sich dabei als wichtigster Faktor herausgestellt, der die Aktivierung der Satellitenzellen reguliert (Allen et al., 1995). Hgf liegt im Muskel in der extrazellulären Matrix (ECM) gebunden vor. Nach einer Verletzung werden NO-Synthasen aktiviert, die NO produzieren (Tatsumi et al., 2002; Wozniak und Anderson, 2007). Dadurch kommt es zur Aktivierung von Matrixmetalloproteasen, durch welche die ECM degradiert wird und Hgf freigesetzt wird (Tatsumi et al., 2002; Anderson, 2000). Die Hgfs können dann mit Ihrem Rezeptor c-met auf den Satellitenzellen interagieren und die sie in einen aktiven Zustand überführen (Tatsumi et al., 1998; Cornelison und Wold, 1997). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass auch "Fibroblast-like growth factors" (Fgfs) an der Aktivierung beteiligt sind (Cornelison et al., 2001). Auch die Proliferation und Differenzierung der Satellitenzellen und Myoblasten wird durch extrinsische Faktoren kontrolliert. Dabei haben sich neben Hgf und Fgfs die "Insulin-like growth factors" (Igfs) und Mitglieder der "Transforming growth factors β " (Tgf β) als die Faktoren herausgestellt, die Einfluss auf die Satellitenzellen während der Regeneration nehmen.

Hgf stimuliert die Proliferation von Myoblasten *in vivo*, während die Differenzierung inhibiert wird. Fgfs beeinflussen maßgeblich die Proliferation von Satellitenzellen (Sheehan und Allen, 1999). Es konnten mehrere Fgfs, darunter Fgf1, Fgf2, Fgf4 und Fgf6, identifiziert werden, die die Proliferation von kultivierten Satellitenzellen stimulierten (Kastner et al., 2000). Auch die Überexpression des "Fibroblast growth factor receptor 1" (*Fgfr1*) zu einer gesteigerten Proliferation und einer verzögerten Differenzierung, während die Inhibition der endogen exprimierten Fgfs zu einer verstärkten Differenzierung führt (Lefaucheur et al., 1996; Scata et al., 1999). So konnte in *mdx*-Mäusen, einem Modell für Duchenne-Muskeldystrophie, die zusätzlich eine *Fgf6*-Defizienz aufweisen, eine erhebliche Störung der Muskelregeneration

festgestellt werden (Floss et al., 1997). Ebenso zeigen *Fgfr4*-defiziente Mäuse schwere Defekte während des Regenerationsprozesses, die durch dysmorphe Muskelfasern, sowie Calcifizierung des Gewebes und die Einlagerung von Fettgewebe charakterisiert sind (Zhao et al., 2006).

Igfs können sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Satellitenzellen positiv stimulieren (Allen und Boxhorn, 1989; Coleman et al., 1995; Doumit et al., 1993; Florini et al., 1991; Philippou et al., 2007). Obwohl der positive Effekt von Igfs auf die Regeneration hinreichend bekannt ist, sind die exakten Wirkmechanismen der Igfs während dieses Prozesses noch nicht bekannt (Chargé und Rudnicki, 2004). Igfs werden in regenerierender Muskulatur exprimiert (Keller et al., 1999). Die Überexpression von Igf1 in *mdx*-Mäusen, einem Mausmodell für die Duchenne-Muskeldystrophie, führt zu einer Zunahme von Myonuklei als auch von Muskelfasern (Barton et al., 2002). Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster von Igf1 und Igf2 ist es möglich, dass diese während der Muskelregeneration unterschiedliche Aufgaben erfüllen. So wird Igf2 erst während der Differenzierung exprimiert .

Mitglieder der Tgf β -Familie sind ebenfalls an der Regulation der Regeneration beteiligt (Allen und Boxhorn, 1987; Allen und Boxhorn, 1989). Tgf β 1 ist das am besten charakterisierte Mitglied dieser Familie in Bezug auf die adulte, regenerative Myogenese. *In vitro* inhibiert Tgf β 1 sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Myoblasten. Eine negative Regulation der Regeneration durch Tgf β 1 konnte *in vivo* bestätigt werden. So zeigen sowohl *mdx*-Mäuse als auch *fibrillin1*-defiziente Mäuse eine erhöhte Anzahl Satellitenzellen nach der systemischen Applikation eines Tgf β 1-neutralisierenden Antikörpers (Bogdanovich et al., 2002; Cohn et al., 2007) .

Ein weiteres Mitglied der Tgf β -Familie "Myostatin" ist ebenfalls als ein negativer Regulator der adulten Myogenese. *Myostatin*-defiziente Mäuse zeigen erheblich vergrößerte Muskeln bei der Geburt (McPherron et al., 1997). Diese Muskeln zeigen sowohl eine erhöhte Anzahl von Muskelfasern sowie deren Vergrößerung des Durchmessers. Da eine *Myostatin*-Defizienz in *mdx*-Mäusen zunächst positive Effekte, wie vergrößerte Muskeln und weniger Fibrose, bewirkte, galt Myostatin als potentiell Ziel bei der Behandlung von Muskelerkrankungen (Wada et al., 2002; Bogdanovich et al., 2002).

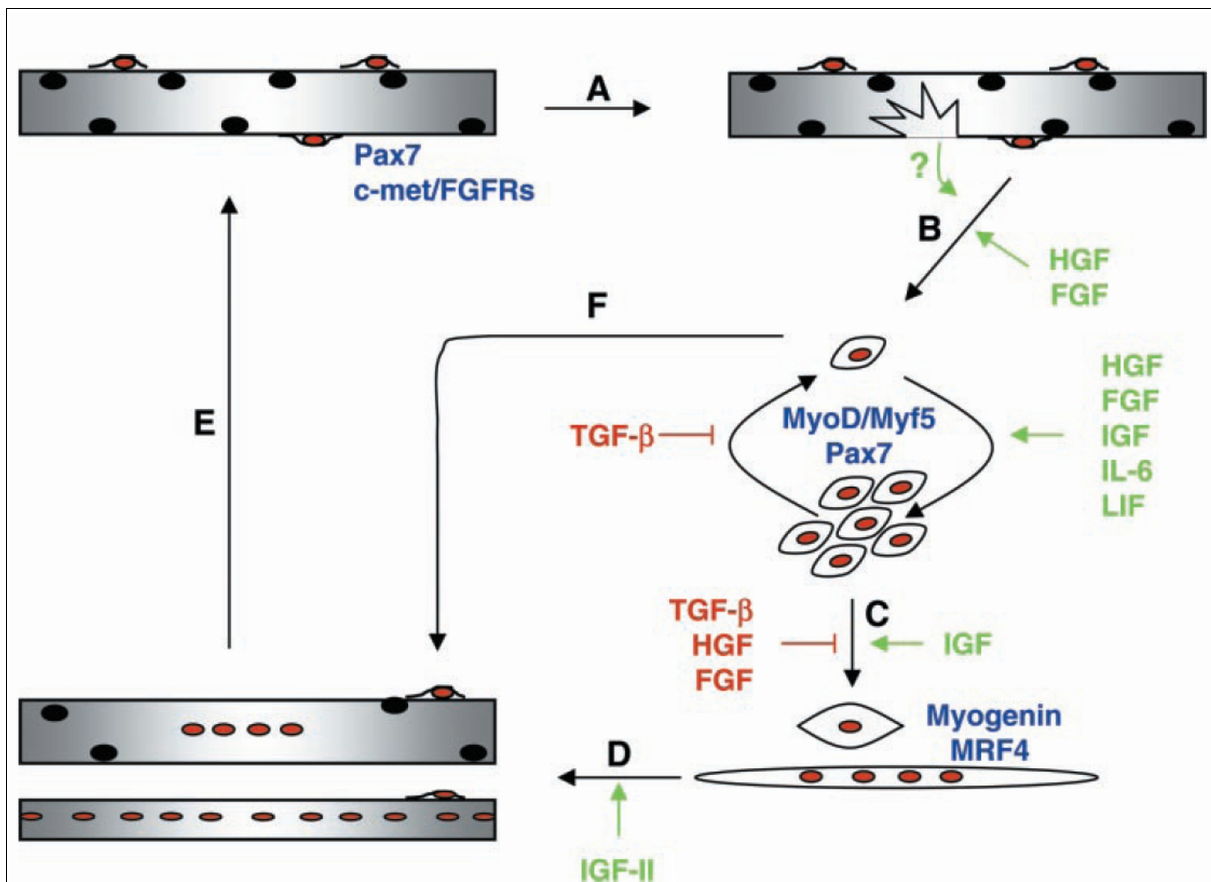


Abbildung 3: Die Regulation der Regeneration durch extrinsische Signalmoleküle.

Schematische Darstellung der sekretierten Faktoren, die das Verhalten von Satellitenzellen nach einer Verletzung der Muskelfaser(A) regulieren. Nach der Aktivierung der Satellitenzelle aus dem Ruhezustand (B), bringen die Satellitenzellen Myoblasten hervor, die nach Ihrer Bestimmung zu Differenzierung aus dem Zellzyklus austreten und zu fusionieren beginnen (C). Dabei fusionieren die Myoblasten entweder mit sich selbst um neue Muskelfasern zu bilden oder beschädigte Fasern zu reparieren (D). Anschließend erfolgt die Reifung der Muskelfaser, bis diese in Größe und Funktion die ursprünglichen Fasern ersetzen kann (E). Während der Regeneration kehren einige Myoblasten in den Ruhezustand zurück und werden zu neuen Satellitenzellen (F). Die einzelnen Stadien der Regeneration sind durch die Expression der spezifischen Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren charakterisiert (blaue Schrift). Sekretierte Faktoren können die einzelnen Regenerationsschritte sowohl positiv (grüne Schrift) als auch negativ (rote Schrift) regulieren. (modifiziert nach Chargé und Rudnicki, 2004).

Mittlerweile konnte jedoch festgestellt werden, dass die Blockade von Myostatin während der Regeneration des Muskels keinen Einfluss auf die Aktivität von Satellitenzellen nimmt. Dabei scheinen die Fasern durch den Verlust von Myostatin zwar vergrößert, die Anzahl der Myonuklei hingegen bleibt aber konstant, wodurch die Zunahme der Muskelmasse wahrscheinlich auf eine erhöhte Proteinsynthese zurückgeführt werden kann (Amthor et al., 2009).

1.2.5 Die Bedeutung von Satellitenzellen bei der Pathologie primärer Myopathien

Eine überaus wichtige Rolle spielen Satellitenzellen bei der Pathologie primärer Myopathien. Ein Großteil dieser Erkrankungen wird durch Mutationen in Proteinen ausgelöst, die eine supramolekulare Verbindung zwischen dem Cytoskelett der Muskelfaser und der extrazellulären Matrix herstellen, wodurch die Übertragung von Kraft gewährleistet wird (Nawrotzki et al., 1996). Die bekannteste Erkrankung in diesem Bereich ist die Duchenne-Muskeldystrophie, die durch eine Mutation im *Dystrophin*-Gen verursacht wird (Hoffman et al., 1987; Koenig et al., 1988). Obwohl der Mechanismus weitestgehend unklar ist, führt der durch Muskelkontraktion verursachte mechanische Stress zur Degeneration des Muskels bzw. der Muskelfaser (Cossu und Mavilio, 2000). In der frühen Phase der Erkrankung werden neue Muskelfasern durch Satellitenzellen dem degenerierten Muskel hinzugefügt. Die eng aufeinander folgenden Zyklen von Degeneration und Regeneration führen bereits früh zu einer Erschöpfung des Satellitenzellpools, so dass in einer späteren Phase der Erkrankung keine Regeneration mehr stattfindet und der Muskel durch fibröses Gewebe ersetzt wird (Webster und Blau, 1990). Dies führt in letzter Konsequenz zur vollständigen Paralyse und letztendlich zum Tode (Cossu und Mavilio, 2000).

Transplantierte Satellitenzellen stellen heutzutage ein therapeutisches Ziel zur Behandlung von Muskeldystrophien dar. Als problematisch erweist sich dabei die Abstoßungsreaktionen bei heterologen Transplantationen. Daher stellt die autologe Transplantation von *ex vivo* genetisch veränderten Myoblasten eine gute Alternative dar (Blau und Springer, 1995). Dabei soll z.B. im Falle einer Dystrophin-Defizienz, eine verkürzte Variante des Proteins viral in Myoblasten exprimiert werden. Nach der *ex vivo* Expansion dieser Zellen könnten diese dann retransplantiert werden.

Aufgrund des geringen Potentials dieser Myoblasten zu proliferieren, ist diese Methode zur Zeit ineffektiv um den Muskel zu regenerieren (Salvatori et al., 1993; Huard et al., 1994).

1.2.6 *in vitro* und *in vivo* Regenerationsmodelle

Um den Regenerationsprozess zu untersuchen, stehen mittlerweile eine Vielzahl von *in vivo* und *in vitro/ex vivo* Systemen zur Verfügung.

Die C2C12 Zelllinie ist die am häufigsten verwendete Zelllinie, die zur Untersuchung der Regeneration verwendet wird. Diese Zellen, einem Klon der ursprünglichen C2 Zelllinie, wurden ursprünglich aus dem regenerierenden Muskel einer Maus gewonnen und zeigen die charakteristischen Eigenschaften von Myoblasten (Yaffe und Saxel, 1977; Blau et al., 1983). Der Entzug von Wachstumsfaktoren sowie ein enger Zell-Zell-Kontakt führen zur Differenzierung der Zellen und zur Bildung von Myotuben, weshalb sie ein gutes Modell zur Analyse der Muskelregeneration und -differenzierung darstellen. Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise, dass Satellitenzellen bzw. Myoblasten und die immortalisierten C2C12 Zellen auch Unterschiede aufweisen (Cornelison, 2008). So wurde neben Unterschieden in der äußeren Erscheinung auch über Unterschiede in der Genexpression berichtet. Dies spiegelt sich des Weiteren darin wider, dass diese Zellen in Adipozyten und Osteoblasten transdifferenzieren können. Eine Transdifferenzierung in Osteoblasten erfordert aber, im Gegensatz zur myogenen Differenzierung, die Behandlung mit exogenen Faktoren wie "Bone morphogenetic proteins" (Bmps) (Katagiri et al., 1994). Die Differenzierung in Adipozyten kann durch die Stimulation des "peroxisome proliferator activated receptor gamma" (Pparg) induziert werden (Teboul et al., 1995). Ein geeigneteres Modellsystem stellen primäre Myoblasten dar, die *ex vivo* kultiviert werden (Rosenblatt et al., 1995). Dabei kann die frühe Regeneration an einem Modell untersucht werden, in welchem die Satellitenzellen auf der dazugehörigen Muskelfaser kultiviert werden. Es ist hinreichend bekannt, dass die Satellitenzellen in diesem System die charakteristischen Transkriptionsfaktoren exprimieren. Die späteren Schritte der Differenzierung können aber in diesem Modell nicht untersucht werden, da eine Fusion der Myoblasten mit der Muskelfaser nicht stattfindet (Bischoff, 1986b). Dieses Problem kann umgangen werden, indem man die Satellitenzellen mit der Muskelfaser auf einem Kultursubstrat adhäriert, wodurch die

Satellitenzellen von der Muskelfaser abwandern und dann eine Vielzahl von Myoblasten hervorbringen, die durch ein Herabsetzen der Serumkonzentration in Myotuben differenzieren (Partridge, 1997).

Zusätzlich gibt es zahlreiche *in vivo* Regenerationsmodelle. So gibt es unter anderem Mausmutanten, wie z.B. die *mdx*-Maus, deren Muskulatur durch eine Mutation im Dystrophin-Gen permanent aktiv regeneriert (Heilig et al., 1987; Bulfield et al., 1984). In anderen *in vivo* Modellen werden der Muskulatur Verletzungen zugefügt, z.B. durch Injektion von Schlangengiften wie Cardiotoxin oder Notexin (Harris und Johnson, 1978; Harris et al., 1974; d'Albis et al., 1988). Ein geeignetes Modell um die Regeneration des Muskels in Mäusen zu untersuchen, ist das in dieser Arbeit untersuchte Traumamodell (Schmitz et al., 2009). Dabei wird ein stumpfes Trauma durch ein auf den Wadenmuskel herabfallendes Gewicht induziert. Im Verhältnis zu den oben genannten induzierten Verletzungen ist dieses Trauma mild und reflektiert so die Regeneration, wie sie auch nach Sportverletzungen oder Unfällen vorkommt.

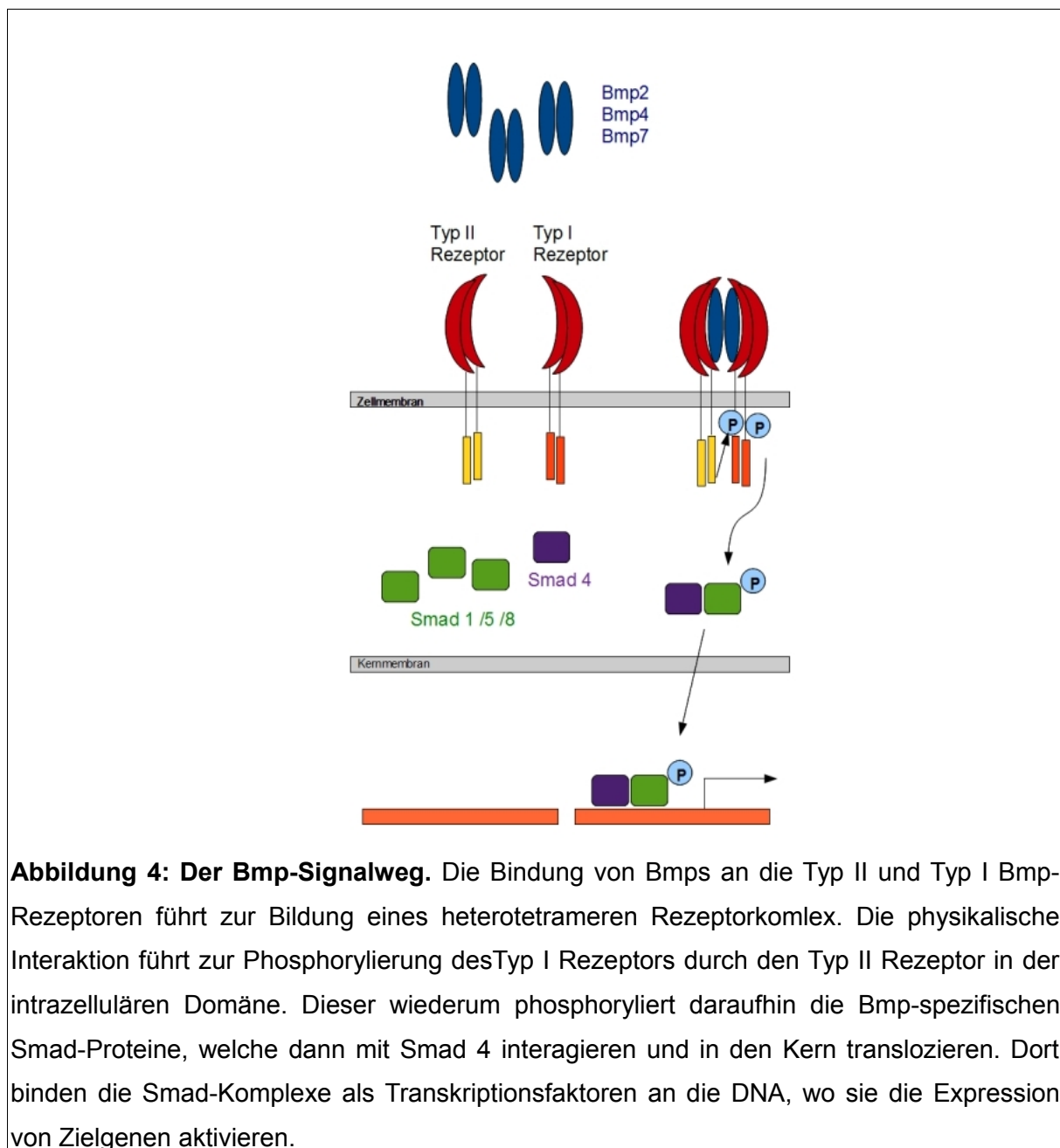
1.3 Der Bmp-Signalweg

Die "bone morphogenetic proteins" (Bmps) stellen eine eigene Gruppe innerhalb der "transforming growth factors β " (TGF β) Familie dar. Die TGF β -Familie umfasst mehr als 50 Mitglieder, die eine Vielzahl biologischer Prozesse während der Embryonalentwicklung und auch postnatal regulieren. Die Signalkaskade, die durch Bmps induziert wird ist in Abbildung 4 dargestellt.

Wie alle Mitglieder der TGF β -Familie werden Bmps als inaktive Proproteine synthetisiert. Nach Dimerisierung erfolgt intrazellulär die Abspaltung der Prodomäne durch Proprotein Convertasen wie z.B. Furin, wodurch ein aktives Bmp-Dimer entsteht, welches in den extrazellulären Raum sekretiert wird (Massagué, 1998a; S. Itoh et al., 2000). Dort binden Sie an spezifische Typ I und Typ II Bmp-Rezeptoren um den Bmp-Signalweg zu aktivieren (Massagué, 1998b; Derynck und Feng, 1997). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Serin/Threonin Kinase Rezeptoren, die jeweils Homodimere bilden (Massagué, 1998b; Derynck und Feng, 1997).

Die Bindung aktiver Bmps an Ihre Rezeptoren führt zur Bildung eines heterotetrameren Rezeptorkomplexes. Durch die Bindung von Bmp an den Rezeptorkomplex kommt es zur Konformationsänderung des konstitutiv aktiven Rezeptor des Typ II, wodurch der Typ I Rezeptor in der intrazellulären Domäne

phosphoryliert wird. Infolge dessen kommt es zur Phosphorylierung der Bmp-spezifischen, Rezeptor-regulierten Smad-Proteine.



Die Familie der Smad-Proteine umfasst die acht Mitglieder Smad1-8 (Massagué, 1998a; DiMario und Strohman, 1988). Neben den Rezeptor-regulierten Smad-Proteinen Smad1, 2, 3, 5 und 8 kommen die inhibitorischen Smad-Proteine Smad6 und Smad7, sowie ein sogenanntes Co-Smad Smad4 vor, das mit allen R-Smads interagiert. Die Aktivierung der Bmp-Rezeptoren führt spezifisch zu Phosphorylierung von Smad1, 5 und 8, während Smad2 und Smad3 durch die Aktivierung der Tgfβ-

und Activin-Rezeptoren phosphoryliert werden. Die phosphorylierten Smads dimerisieren anschließend mit Smad4, woraufhin sie vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren, um dort als Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen zu regulieren.

1.3.1 Der nicht-kanonische Bmp-Signalweg

Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien, die zeigen, dass Bmp-Signale eine Smad-unabhängige Signalkaskade induzieren können (Derynck und Zhang 2003). Dabei werden "mitogen activated protein kinases" (Mapks) aktiviert, die zahlreiche zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose regulieren. Ein wichtiger Faktor, der für die Induktion dieses Signalwegs benötigt wird ist die "Tgfb β activated kinase 1" (Tak1), eine Mapkkk, deren Kinase-Aktivität durch Bmp-Signale aktiviert wird. Dies führt zur Phosphorylierung von Mkk6/3, wodurch wiederum p38 phosphoryliert bzw. aktiviert werden kann (Enslen et al., 2000). p38 phosphoryliert Transkriptionsfaktoren im Zellkern, wodurch die Genexpression aktiviert wird. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass Tak1, zumindest während der Chondrozytendifferenzierung, ebenfalls an der Regulation des kanonischen Bmp-Signalwegs beteiligt ist (Shim et al., 2009).

1.3.2 Inhibitoren des Bmp-Signalwegs

Neben den inhibitorischen Smad-Proteinen, die eine Signaltransduktion innerhalb der Zelle verhindern können, kann die Bindung der Bmps an ihre Rezeptoren durch spezifische sekretierte Inhibitoren verhindert werden.

Innerhalb der Gruppe der Bmp-Inhibitoren zeigen Noggin und Chordin eine spezifische Interaktion mit Bmp2, Bmp4 und Bmp7 um deren Aktivität zu unterbinden. Noggin ist ein dominanter Bmp-Inhibitor, der durch Bindung an Bmp-Dimere die Epitope, die zur Interaktion mit dem Rezeptor benötigt werden verdeckt und so die Interaktion mit dem Rezeptor verhindert (Groppe et al., 2002). Da Noggin selektiv die Aktivität von Bmps inhibiert und sich aufgrund seiner geringen Größe von 22 kDa rekombinant herstellen lässt, wird dieser Inhibitor häufig verwendet um Bmp-Signale spezifisch zu inhibieren und die Rolle von Bmp-Signalen zu untersuchen.

Bei dem Bmp-Inhibitor Chordin handelt es sich um ein 120 kDa großes Protein. Auch für Chordin konnte gezeigt werden, dass dieser Inhibitor spezifisch die Bindung von

Bmp2, Bmp4 und Bmp7 inhibiert (Piccolo et al., 1996). Darüber hinaus können weitere Proteine die anti-Bmp-Wirkung von Chordin verstärken aber auch seine Degradation induzieren. So bindet "Twisted gastrulation" an Chordin und Bmps, wodurch der Chordin-Bmp Komplex stabilisiert wird. Andererseits erleichtert diese Bindung die Spaltung und damit die Inaktivierung von Chordin durch die Tolloid-Metalloproteasen (Zhang et al., 1995; De Robertis, 2009). Die genauen Mechanismen sind jedoch nur wenig charakterisiert.

1.3.3 Die Rolle von Bmp-Signalen während der Myogenese

Die Wirkung von Bmp-Signalen wurde intensiv in C2C12 Zellen untersucht, jedoch im Kontext der Osteoblastendifferenzierung (Katagiri et al., 1994, 1997). Die Behandlung dieser Zellen mit Bmp2 führt zur Aktivierung der osteoblastenspezifischen Genexpression. Die Injektion von Bmps in den Muskel sowie die Überexpression von Bmp4 in transgenen Mäusen führt zu intensiver Bildung von Knochen in der Muskulatur (Urist und Strates, 1971; Kan et al., 2004). Auch weitere Experimente legten zunächst nahe, dass Bmps effektiv die embryonale Myogenese inhibieren können. So wurde die Bildung von Knorpel in Gliedmaßenanlagen von Hühnerembryonen beobachtet, die mit Bmp2 stimuliert wurden (Duprez et al., 1996). Später konnte jedoch gezeigt werden, dass endogene Bmp-Signale im Hühnerembryo die Expansion von fötalen Myoblasten induzieren und eine frühzeitige Differenzierung verhindern (Amthor et al., 1999). Eine Untersuchung der Wirkung von Bmp-Signalen auf die adulte, regenerative Myogenese blieb jedoch bisher aus.

2. Zielsetzung

Die Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur lässt sich auf das Vorhandensein von Muskelstammzellen, den so genannten Satellitenzellen, zurückzuführen. Da diese Zellen ein mögliches Ziel zur Behandlung von Muskelerkrankungen darstellen, ist es notwendig das Verständnis der Funktionsweise von Satellitenzellen während der Muskelregeneration zu vertiefen.

Für eine Vielzahl von Signalmolekülen konnte gezeigt werden, dass sie den Regenerationsprozess der Muskulatur beeinflussen können. In dieser Arbeit soll speziell die Rolle der "bone morphogenetic proteins" (Bmps) während der Muskelregeneration untersucht werden. Diese Proteine gehören zur Familie der Tgf β -Signalmoleküle und regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse. So konnte gezeigt werden, dass die koordinierte Expression von Bmps und deren Antagonisten während der embryonalen Myogenese essentiell ist. Aufgrund der Tatsache, dass die adulte, regenerative Myogenese die Myogenese während der Embryonalentwicklung zu einem großen Teil rekapituliert, ist es möglich, dass Bmps das Verhalten von Satellitenzellen beeinflussen können.

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe verschiedener Kultursysteme die Wirkung von Bmps auf Satellitenzellen untersucht werden. Dazu sollten sowohl immortalisierte als auch primäre Zellkulturen von murinen Satellitenzellen und Myoblasten untersucht werden. Ziel war es herauszufinden, ob *ex vivo* kultivierte Satellitenzellen auf Bmp-Signale reagieren können. Dazu sollten die intrazellulären Mediatoren des Bmp-Signalwegs, phospho-Smad 1/5/8, nachgewiesen werden und diese in Relation mit satellitenzell-spezifischen Markern gesetzt werden. Um eine endogene Regulation des Bmp-Signalwegs während der Regenerationsprozesses zu untersuchen, sollte die Expression von Bmp-Signalweg-Komponenten in kultivierten Satellitenzellen analysiert werden. Zusätzlich sollten primäre Myoblastenkulturen mit rekombinanten Proteinen behandelt werden und die Auswirkung von Stimulation und Inhibition des Bmp-Signalwegs charakterisiert werden. Neben der Analyse der Proliferation sollte zusätzlich mittels Immunfluoreszenz gegen charakteristische Differenzierungsmarker der Einfluss von Bmp-Signalen auf die Differenzierung der Satellitenzellen detailliert untersucht werden. Des Weiteren sollte eine Charakterisierung des BMP-Signalwegs in der regenerierenden Muskulatur von Mäusen *in vivo* erfolgen (in Kooperation mit

der Arbeitsgruppe "Chirurgische Forschung", Universitätsklinikum Essen). Dazu sollen mittels Immunfärbungen an Muskelquerschnitten die Mediatoren des Bmp-Signalwegs in Satellitenzellen während verschiedener Stadien der Regeneration nachgewiesen werden und mögliche endogen exprimierte Bmp-Signalweg-Komponenten verifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Zellkulturmedien und -zusätze, Antikörper, Oligonukleotide, Geräte und Software mit der entsprechenden Bezugsquelle angegeben.

3.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Chemikalien über die Firmen Roth (Karsruhe) oder Applichem (Darmstadt) bezogen. Alle Lösungen, die gemäß ihrer Verwendung bei der jeweiligen Methode aufgeführt sind, wurden mit deionisiertem Wasser aus einer hauseigenen Milliporeanlage hergestellt.

Chemikalien	Bezugsquelle
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
BrdU	BD Biosciences (Heidelberg)
dNTPs (100 mM)	VWR (Darmstadt)
DPX Mounting Medium	Fluka (Deisenhofen)
Fluorescent Mounting Medium	Dako (Hamburg)
NBT/BCIP Stammlösung	Roche (Mannheim)
Paraformaldehyd	Applichem (Darmstadt)
Toluidinblau	Merck (Darmstadt)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.2 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Collagenase I	Sigma (Taufkirchen)
EvaGreen QPCR Mix II	Bio-Budget (Krefeld)
<i>Taq</i> -Polymerase (Dream Taq)	Fermentas (St. Leon-Roth)

3.1.3 Zellkulturmedien, -seren und -zusätze

Komponente	Bezugsquelle
DMEM	Invitrogen (Karsruhe)
DMEM/F12 (1:1)	Invitrogen (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN (Aidenbach)
Ziegenserum	Invitrogen (Karsruhe)
Hühner-Embryo-Extract	MP Biomedicals (Eschwege)
PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
Pferdeserum	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Serum Replacement 2 (50x)	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin	Invitrogen (Karlsruhe)
Matrigel	BD Biosciences (Heidelberg)

3.1.4 Rekombinante Proteine

Protein	Bezugsquelle
Bmp7	R&D Systems (Wiesbaden)
Noggin	R&D Systems (Wiesbaden)

3.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Bezugsquelle
anti-Pax7 (Hybridoma-Zellkultur-Überstand)	DSHB (Iowa, USA)
anti-MyoD	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti-Myogenin	DAKO (Hamburg)
anti-Myosin (MHC; A4.1025) (Hybridoma-Zellkultur-Überstand)	DSHB (Iowa, USA)
anti-Desmin	Sigma (Taufkirchen)
anti-phospho-Smad1/5/8	Cell Signalling Technology (NEB Frankfurt a.M.)
anti-BrdU	Abcam (Cambridge, UK)
anti-Lama2	Enzo Life Sciences (Lörrach)
anti-cleaved-Caspase 3	Cell Signaling Technology (NEB Frankfurt a.M.)

Sekundärantikörper	Bezugsquelle
anti-Maus Alexa 488	Invitrogen (Karlsruhe)
anti-Kaninchen Alexa 568	Invitrogen (Karlsruhe)
anti-Kaninchen Alexa 488	Invitrogen (Karlsruhe)
anti-Ratte Alexa 568	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.6 verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonucleotide wurden über die Firma Biotex (Berlin) bezogen.

Name	Sequenz (5' → 3')
β2-Microglobulin for	GCTCGGTGACCCTGGTCTTT
β2-Microglobulin rev	GAGGCGGGTGGAAGTGTGTT
Bmp7 for	CCTGTCCATCTTAGGGTTGC
Bmp7 rev	CAGTGAGGAAGTGGCTGTCC
Chordin for	ATAGCCCTGCTCACCTCAGTGACA
Chordin rev	GCTCCAACCAGTCCATCTCTTGGTC
Gapdh for	CCAGGAGCGAGACCCCACTA
Gapdh rev	GCAGTTGGTGGTGCAGGATG
MyoD for	CGAGCACTACAGTGGCGACTCAGAT
MyoD rev	GCTCCACTATGCTGGACAGGCAGT
Myogenin for	CCATCCAGTACATTGAGCGCCTACA
Myogenin rev	ACGATGGACGTAAGGGAGTGCAGAT

3.1.7 Geräte und Software

Geräte	Hersteller
Cryostat	Mikrom (Walldorf)
Elektrophoresekammern	Peqlab (Erlangen), Serva (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert200M)	Zeiss (Göttingen)
Gel-Dokumentationsanlage	INTAS (Göttingen)
Hellfeldmikroskop (Axioplan 2)	Zeiss (Göttingen)
Kamera (Spot 23.0)	Visitron systems (Puchheim)
Nanodrop	Peqlab (Erlangen)
Milliporeanlage	Millipore (Schwalbach)
PCR-Geräte (Thermocycler T3000)	Biometra (Göttingen)

Geräte	Bezugsquelle
Realtime PCR-Gerät (StepOne PLUS)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Stereomikroskop (MZ FLIII)	Leica (Wetzlar)
Sterilbank (HERAsafe, MSC- Advantage)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Sterilbank	BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Zellkultur-Inkubatoren	Labotect (Göttingen)
Zentrifuge (5810R)	Eppendorf (Hamburg)
Software	Gerät
INTAS GDS	Gel-Dokumentation
Metamorph Version X.X	Fluoreszenzmikroskop
Spot Advanced Version 4.5.7	Mikroskope

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Komponente	Bezugsquelle
Biopsiekassetten (Sakura)	Gentaur (Aachen)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Objektträger	Roth (karlsruhe)
Superfrost plus Objektträger	Roth (Karlsruhe)
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm	Millipore (Schwalbach)
Spritzenvorsatzfilter 0,4 µm	Millipore (Schwalbach)
Zellkulturflaschen und -platten	Corning (Kaiserslautern) und Sarstedt (Nümbrecht)

3.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Feuchte von ca. 90%.

3.2.1 Kultivierung von C2C12 Zellen

Die C2C12 Zelllinie (DSMZ, Braunschweig) ist eine immortalisierte, myogene Zelllinie, die in Muskelfasern differenziert werden kann (Yaffe and Saxel, 1977; Blau

et al., 1983).

Nach dem Auftauen wurden die C2C12 Zellen in Kulturmedium überführt und bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert, um das Einfriermedium zu entfernen. 2×10^6 Zellen wurden anschließend in 25 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer 150 cm² Flasche ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml einer 0,05%igen Trypsinlösung inkubiert, bis die Zellen sich vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:50 in Kulturmedium verdünnt und in eine neue Flasche überführt. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle 2 Tage.

Um die Zellen zu differenzieren, wurden 2×10^5 Zellen/cm² in einer Well-Platte ausgesät und für 24 h in Kulturmedium kultiviert. Die Differenzierung wurde induziert, indem das Kulturmedium durch ein serumreduziertes Differenziermedium ersetzt wurde. Die Zellen wurden während der Differenzierung mit 100 ng/ml Bmp7 oder 125 ng/ml Noggin behandelt. Der Wechsel des Mediums und der rekombinanten Proteine erfolgte täglich über einen Zeitraum von 3 Tagen. Für die Proliferationsanalyse wurden 10 µM BrdU in das Medium gegeben und die Zellen für eine weitere Stunde kultiviert. Das Medium wurde anschließend abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 4% PFA/PBS fixiert.

Kulturmedium

DMEM

10% (v/v) FCS

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Trypsinlösung

0,05% (w/v) Trypsin

in 1x PBS

Differenzierungsmedium

DMEM

2% (v/v) Pferdeserum

4% PFA

4% (w/v) Paraformaldehyd

in 1x PBS

3.2.2 Präparation von Muskeleinzelfasern

Diese Methode bietet die Möglichkeit Satellitenzellen auf Muskelfasern zu kultivieren (Rosenblatt et al., 1995). Die Muskelfaser "schwebt" dabei im Kulturgefäß ("floating

fibers").

Zur Vorbereitung wurden zunächst alle Zellkulturschalen mit einer sterilfiltrierten BSA-Lösung beschichtet um eine Adhäsion der Muskelfasern an die Zellkulturschale zu verhindern. Zusätzlich wurden Pasteurpipetten mit verschiedenen Öffnungsgrößen hergestellt. Dazu wurden diese mit einem Diamantmesser am vorderen Ende abgeschnitten und die Schnittkante über der Flamme eines Bunsenbrenners geglättet. Der *Musculus extensor digitorum longus* (EDL) wurde aus der hinteren Gliedmaße einer Maus entfernt. Der Muskel wurde anschließend in einer 0,2%-igen Kollagenaselösung für 90 min im Brutschrank inkubiert. Die Kollagenaselösung wurde anschließend entfernt und der Muskel in Präparationsmedium überführt. Die mechanische Vereinzelung der Muskelfasern erfolgte durch das Ein- und Ausspülen in Pasteurpipetten mit absteigendem Öffnungsdurchmesser. Unter einem Stereomikroskop wurden die intakten Einzelfasern mit Hilfe einer Pasteurpipette in frisches Medium überführt und für 45 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden während der Präparation beschädigte Muskelfasern aussortiert, während die intakten Muskelfasern mit Hilfe einer Pasteurpipette in die Kulturschalen überführt und erneut für 30 min inkubiert wurden. Das Präparationsmedium wurde anschließend unter dem Stereomikroskop mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und durch ein steriles Kulturmedium ersetzt. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von maximal 3 Tagen ohne Wechsel des Mediums.

Die Behandlung der Muskeleinzelfasern mit 125 ng/ml Bmp7 erfolgte in serumfreien Medium für 18 h.

Im Anschluss wurden die Fasern in PBS gewaschen und für die Immunfluoreszenz für 20 min bei Raumtemperatur in 4% PFA/PBS fixiert.

BSA-Lösung

PBS

10% (w/v) BSA

Collagenase-Lösung

DMEM/F12 (1:1)

0,2 % (w/v) Collagenase I

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Präparationsmedium

DMEM/F12 (1:1)

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Kulturmedium

DMEM/F12 (1:1)

10% (v/v) Pferdeserum

0,5% (v/v) Hühner-Embryo-Extrakt

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

serumfreies Medium (SR)

DMEM/F12 (1:1)

20% (v/v) Serum Replacement 2

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

3.2.3 Myoblastenkulturen

Mit dieser Methode können Myoblasten in großem Maßstab kultiviert und in Myotuben differenziert werden (Partridge, 1997). Um reine Myoblastenkulturen herzustellen, wurden zunächst Einzelfasern präpariert und für eine Nacht in Kulturmedium kultiviert (vgl. 3.2.2). Dadurch konnten kontaminierende Zellen (z.B. Fibroblasten), die während der Präparation der Einzelfasern aus dem Muskelverband herausgelöst wurden, an die Zellkultuschalen adhären und von den Fasern getrennt werden. Da Myoblasten nicht an Zellkulturplastik adhären können, wurden 24-Well-Platten mit Matrigel, einer gelösten Basalmembranmatrix, beschichtet. Die Platten wurden zum Auspolymerisieren des Matrigels für 20 min im Brutschrank gelagert. Anschließend wurde jeweils eine einzelne Muskelfaser in jedes einzelne Well transferiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation, in der die Faser an das Substrat adhärierte, wurde Proliferationsmedium mit hohen Konzentrationen von Wachstumsfaktoren zu den Einzelfasern gegeben. Da Satellitenzellen auf Matrigel migrieren können, waren die Satellitenzellen nach einem Tag von der Muskelfaser auf das Kultursubstrat abgewandert. Die Muskelfaser wurde beim Wechsel des Mediums nach 2 Tagen entfernt.

Nach einer 4-tägiger Expansion der Myoblasten wurden deren Differenzierung eingeleitet. Dazu mussten die Satellitenzellklone folgende Voraussetzungen erfüllen: (1) alle Klone mussten frei von anderen Zelltypen wie Endothelzellen und Fibroblasten sein; (2) die Klone mussten eine ähnliche Zelldichte besitzen und durften keine durch eine hohe Zelldichte hervorgerufene Fusion der Myoblasten aufweisen. Die Differenzierung in einem serumreduzierten Differenzierungsmedium erfolgte für bis zu 5 Tagen. Behandlungen mit 100 ng/ml Bmp7 und 125 ng/ml Noggin wurden für 3 Tage durchgeführt, wobei das Differenzierungsmedium und die rekombinanten Proteine täglich gewechselt wurden. Die Kulturen wurden

anschließend in PBS gewaschen und für 20 min in 4% PFA/PBS bei Raumtemperatur in der Wellplatte fixiert.

Zur Analyse der Proliferation wurde 10 μ M BrdU für 2 Stunden zu den Kulturen gegeben. Dieser Schritt erfolgte entweder zum Ende der Differenzierung (vgl. 4.2.6) oder direkt vor Beginn der Differenzierung ("pulse-chase" Experiment; vgl. 4.2.7).

Matrigel

DMEM

10% (v/v) Matrigel

Proliferationsmedium

DMEM/F12 (1:1)

10% (v/v) Pferdeserum

20% (v/v) FCS

1% (v/v) Hühner-Embryo-Extrakt

1% (v/v) Penicillin/Strptomycin

Differenzierungsmedium

DMEM/F12 (1:1)

10% (v/v) Pferdeserum

2% (v/v) FCS

0,5% (v/v) Hühner-Embryo-Extrakt

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

3.2.4 Nachweis von Alkalischer Phosphatase in Zellkulturen

Alkalischer Phosphatase hydrolysiert Phosphorsäureester unter basischen Bedingungen. Durch die Reaktion mit einem chromogenen Substrat, NBT/BCIP kann die spezifische Enzymreaktion sichtbar gemacht und so direkt nachgewiesen werden. Dabei reagiert das lösliche, nahezu farblose Substrat zu einem unlöslichen, tiefblauen Farbstoff.

Die Zellen wurden dazu zunächst in PBS gewaschen und anschließend für 10 min in 4% PFA/PBS fixiert. Darauf erfolgten 3 Waschschrte in PBS für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Zellen in NTM für 10 min vorinkubiert und schließlich mit NBT/BCIP in NTM für 45 min inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen in PBS gewaschen und die Reaktion dadurch gestoppt.

Um die Integrität der Reaktion zu überprüfen, wurde eine Positivkontrolle durchgeführt. Dazu wurden die fixierten Zellen mit einem Alkalische Phosphatase-Fgf8 Fusionsprotein vorinkubiert (zur Verfügung gestellt von Dr. Kai Grobe und Dr. Tabea Dierker). Durch die Interaktion von Fgf8 mit Heparansulfaten auf der Oberfläche der Zellen wird das Fusionsprotein gebunden und konnte mit Hilfe der

beschriebenen Farbreaktion nachgewiesen werden.

NTM

100 mM Tris pH 9,5
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂

NBT/BCIP Färbelösung

NTM
2% (v/v) NBT/BCIP Stammlösung

3.3 Histologie

3.3.1 Einbetten von Muskelgewebe für Gefrierschnitte

Nach Entnahme des *Musculus gastrocnemius* aus der Wade der Maus wurde dieser in eine mit flüssigem Einbettmedium (OCT) gefüllte Biopsiekassette gegeben und ausgerichtet. Um ein schnelles Einfrieren zu garantieren wurde ein Becherglas mit Isopentan in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das Isopentan war auf die gewünschte Temperatur von ca. -150°C abgekühlt wenn erste Kristalle auf dem Boden des Becherglases sichtbar wurden. Die Biopsiekassette wurde in das Isopentan eingetaucht und für ca. 15 sek unter ständiger Bewegung eingefroren. Die eingefrorenen Präparate wurden anschließend bei -80°C gelagert.

3.3.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Muskelpräparate wurden zunächst im Cryostat auf -20°C äquilibriert. Anschließend wurden 10 µm Schnitte angefertigt, die auf Superfrost plus Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 1 Stunde getrocknet. Wurden die Schnitte nicht direkt weiterbearbeitet konnten sie bei -20°C aufbewahrt werden.

3.3.3 Histologische Färbung von Gewebeschnitten mit Toluidinblau

Die Objektträger wurden zunächst in Leitungswasser gewaschen um das Einbettmedium zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation in der Toluidinblau-Färbelösung für 1 min. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 75%, 95% und 100% Ethanol) dehydriert und anschließend in Xylol inkubiert. Die Schnitte wurden mit DPX-Mounting Medium eingedeckelt. Die Dokumentation erfolgte an einem Hellfeldmikroskop.

Färbelösung

1% (w/v) Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$) in H_2O

0,2% (w/v) Toluidinblau

3.4 Immunchemische Methoden

3.4.1 Vorbereiten der Gewebeschnitte für die Immunfluoreszenz

Nach vollständigem Trocknen der Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden diese für 2 x 5 min in PBS gewaschen um das Einbettmedium zu entfernen. Die Fixierung erfolgte für 20 min in 4% PFA/PBS. Nach 2 weiteren Waschschritten wurden die Objektträger am äußeren Rand trocken gewischt, die Schnitte mit einem Fettstift eingekreist und die Objektträger in PBS erneut gewaschen.

3.4.2 Immunfluoreszenz

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunologischen Nachweise von Proteinen und BrdU erfolgten mittels Immunfluoreszenz, wobei alle Nachweise nach dem selben Protokoll durchgeführt wurden. Die Prozessierung der Muskeleinzelfasern erfolgte dabei in einer Wellplatte unter dem Binokular. Die C2C12 Kulturen und adhärenenten Myoblastenkulturen wurden in der Wellplatte behandelt, während die Waschschrritte der Objektträger in einer Küvette durchgeführt wurden. Die Inkubation der Gewebeschnitte mit Antikörpern erfolgte in einer befeuchteten Kammer.

Alle fixierten Präparate wurden zu Beginn in PBS gewaschen. Es erfolgte anschließend die Permeabilisation in 0,5% PBT für 5 min bevor die Präparate erneut kurz in PBS gewaschen wurden. Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern wurden die Präparate für 45 min in Blockierungsreagenz inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Präparate mit dem Erstantikörper, der in Blockierungsreagenz verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C. Die Antikörperlösung wurde abgenommen und die Präparate in 0,05% PBT 3 mal für 5 min gewaschen. Die Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern, die in Blockierungsreagenz verdünnt wurde, erfolgte im Dunkeln bei RT für 45 min. Die Präparate wurden erneut für 3 mal 10 min gewaschen. Es erfolgte anschließend die Inkubation in einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Lösung, einem

Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die DNA einlagert und daher zur Detektion der Zellkerne verwendet wird. Das DAPI wurde in zwei weiteren Waschrissen à 5 min abgewaschen. Die Zellkulturen wurden anschließend direkt mikroskopiert, da diese -in PBS gelagert- nur kurze Haltbarkeit aufweisen. Die Muskeleinzelfasern wurden auf Objektträger transferiert und wie die Gewebeschnitte mit Fluoreszenz-Mounting-Medium eingedeckelt.

Nachweis von BrdU

Der Nachweis von BrdU erforderte vor Beginn der Prozedur die Behandlung mit 2N HCl, um die DNA, in der das BrdU während der S-Phase eingebaut wurde, zu denaturieren. Die Präparate wurden anschließend 2 mal für 5 min in 0,1 M Borax neutralisiert und in PBS überführt.

Tabelle 1: Herkunftsorganismus und eingesetzte Verdünnung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Herkunfts-organismus	eingesetzte Verdünnung
anti-Pax7 (Hybridoma-Zellkultur-Überstand)	Maus	1:5
anti-MyoD	Kaninchen	1:75
anti-Myogenin	Maus	1:50
anti-Myosin (MHC; A4.1025) (Hybridoma-Zellkultur-Überstand)	Maus	1:10
anti-Desmin	Kaninchen	1:50
anti-phospho-Smad1/5/8	Kaninchen	1:200
anti-BrdU	Ratte	1:500
anti-Lama2	Ratte	1:500
anti-cleaved-Caspase 3	Kaninchen	1:200
anti-Ratte Alexa 568	Ziege	1:500
anti-Maus Alexa 488	Ziege	1:500
anti-Kaninchen Alexa 568	Ziege	1:500
anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	1:500

0,5% PBT

PBS

0,5% (v/v) Triton X 100

0,05% PBT

PBS

0,05% (v/v) Triton X 100

Blockierungsreagenz

0,05% PBT

10% (v/v) Ziegenerum

DAPI-Lösung

PBS

100 ng/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol

3.5 Molekularbiologische Methoden**3.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben**

Die Präparation von Gesamt-RNA der Muskelfasern erfolgte mit dem "NucleoSpin RNA XS" Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Pro Ansatz wurde die RNA von ca. 100 Einzelfasern mit den darauf befindlichen Satellitenzellen präpariert. Die isolierte RNA der einzelnen Präparationen wurde vollständig zur cDNA-Synthese (vgl. 3.5.3) eingesetzt.

Um die RNA aus ganzen Muskeln zu isolieren wurde das Gewebe zunächst gewogen und in 1 ml Trizol pro 50 mg Gewebe aufgenommen. Anschließend wurden die Muskeln bei steigender Umdrehungszahl für 45 Sekunden mit einem Homogenisator homogenisiert. Die RNA Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt und 1 µg der RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt.

3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch im Nanodrop.

Aufgrund der spektralen Eigenschaften der in Nukleinsäuren enthaltenen Basen absorbieren diese UV-Licht maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Dadurch lässt sich die optische Dichte (OD) einer Nukleinsäure-Lösung ermitteln. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Um die Reinheit der RNA zu bestimmen, wurde die Absorption der Lösung bei $\lambda = 280$ nm bestimmt, da die aromatischen Aminosäuren in Proteinen bei dieser Wellenlänge ein

Absorptionsmaximum aufweisen. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} einer reinen RNA soll dabei einen Wert von ca. 2 aufweisen.

3.5.3 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem "SuperScript III First-Strand Synthesis System" (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde eine zur einer mRNA komplementäre DNA synthetisiert, die zur Genexpressionsanalyse mittels PCR eingesetzt wurde.

3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lässt sich DNA spezifisch amplifizieren (Mullis and Faloona, 1987). Sie erfordert die Zugabe einer hitzebeständigen bakteriellen DNA-Polymerase und eines dNTP-Gemischs zur DNA. Die Kenntnis der Nukleotid Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Stücks macht den Einsatz synthetischer Oligonukleotide möglich, die spezifisch an gegenläufige Nukleotid-Sequenzen der komplementären DNA-Stränge binden. Im ersten Schritt wird bei der PCR durch eine Temperatur von 94°C ein Denaturieren der beiden komplementären DNA-Stränge erreicht. Anschließend erfolgt im nächsten Schritt die Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNA (Annealing), wobei die Temperatur Oligonucleotidspezifisch ist. Im dritten Schritt erfolgt die Oligonukleotid-Verlängerung (Elongation), bis wieder doppelsträngige DNA vorliegt. Die Temperatur beträgt dabei 72°C und entspricht dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Die PCR wurde folgendermaßen angesetzt:

1 µl	cDNA
0,1 µl	5'Oligonukleotid (100 pmol/µl)
0,1 µl	3'Oligonukleotid (100 pmol/µl)
0,2 µl	dNTPs (100 mM)
2,5 µl	10x Dream <i>Taq</i> -Puffer
1,25 µl	DMSO
0,2 µl	Dream <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
ad 25 µl	H ₂ O

Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt:

1.	Denaturierung der DNA	95°C	5 min	
2.	Denaturierung der DNA	95°C	30 sec	35x
3.	Annealing	57-62°C	20 sec	
4.	Elongation	72°C	1 min	
5.	Elongation	72°C	7 min	

3.5.5 Realtime-quantitative PCR

Die Realtime PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR basiert (vgl. 3.5.4). Da bei diesem Verfahren Farbstoffe während der PCR in die DNA interkalieren, ist die Zunahme der Fluoreszenz, die am Ende jedes PCR-Zyklus bestimmt wird, direkt proportional zur Zunahme der Menge an DNA. Um die relativen Expressionsunterschiede eines Gens in verschiedenen Proben ermitteln zu können, wird die Expression üblicherweise ins Verhältnis mit der Expression eines sogenannten "Housekeeping-Gens", dessen Expression nicht durch den Zellzyklus, Stress etc. geändert wird, in der jeweiligen Probe gesetzt.

Während der realtime PCR wird nach jedem Zyklus die Fluoreszenz in den einzelnen Proben bestimmt. Da die Quantifizierung nur in der exponentiellen Phase der PCR durchgeführt werden kann, wird der ct-Wert (cycle threshold = Schwellenwert-Zyklus) bestimmt, bei dem die Fluoreszenz in der Probe über das Hintergrundrauschen hinaus ansteigt. Mit Hilfe dieser Werte wurde die relative Expressionsänderung nach der Methode von Pfaffl ermittelt (Pfaffl, 2001). Die Expression der getesteten Gene wurde auf die Expression des "Housekeeping-Gens" β 2-Microglobulin normalisiert.

Die Durchführung der PCR erfolgte mit Hilfe des "EVA green QPCR master mix" (Biobudget) nach Angaben des Herstellers. Die PCR wurde folgendermaßen angesetzt:

1 μ l	cDNA (vorverdünnt)
100 nM	5'Oligonukleotid (100 pmol/ μ l)
100 nM	3'Oligonukleotid (100 pmol/ μ l)
4 μ l	5x EvaGreen QPCR mix
ad 20 μ l	H ₂ O

Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

1.	Denaturierung der DNA	95°C	15 min	
2.	Denaturierung der DNA	95°C	30 sec	40x
3.	Annealing	57-62°C	20 sec	
4.	Elongation	72°C	30 sec	
5.	Elongation	72°C	1 min	

3.5.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Bei dieser Methode macht man es sich zu Nutze, dass DNA sich innerhalb eines Spannungsfeldes gemäß ihrer negativen Eigenladung zum positiven Pol hinbewegt. Die Auftrennung innerhalb einer Matrix ist dabei größenabhängig. Als Matrix diente in diesem Fall ein Agarose-Gel, welches 1,2% (w/v) Agarose enthielt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Nach Erkalten des Agarose-Gels wurden die zu analysierende Probe mit 6x Orange G-Auftragungspuffer versetzt und aufgetragen. Zur Fragmentlängenbestimmung wurde zusätzlich ein Größenmarker (GeneRuler 100 bp Ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Spannung wurde zwischen 80 V und 120 V gewählt. Da Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt werden kann, wenn es in die DNA interkaliert ist, konnte das Ergebnis unter UV-Bestrahlung photographisch dokumentiert werden.

6x Orange G-Auftragungspuffer

300 ml/l Glycerin
2 g/l Orange G

50x TAE Puffer

2M Tris Base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1 l

3.6 Tierexperimenteller Ansatz

Die Tierhaltung erfolgte im Zentralen Tierlaboratorium (ZTL) des Universitätsklinikums Essen, sowie in der Maushaltung der Universität Duisburg-Essen im Rahmen der tierschutzrechtlichen Bestimmungen.

3.6.1 Verwendeter Mausstamm

Alle analysierten Kulturen von Satellitenzellen wurden von 8-15 Wochen alten,

männlichen C57Bl6/J Mäusen (Haarlan-Winkelmann; ZTL – eigene Zucht) angefertigt.

3.6.2 Organentnahme

Vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

3.6.3 Muskeltrauma

Die Muskeln zur Untersuchung des Traumas wurden von Frau Dr. Stefanie Flohé und Florian Wirsdörfer der Arbeitsgruppe "Chirurgische Forschung" des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. Bei den verwendeten Mäusen handelte es sich um ca. 8 Wochen alte, männliche Tiere des Stamms Balb/c (Haarlan-Winkelmann).

3.7 Bilddokumentation und Datenanalyse

3.7.1 Bildaufnahme

Die Fluoreszenzbilder wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) mit einer Spot 23.0 Kamera (Diagnostic Instruments) und Metamorph-Software (Visitron Imaging Systems) aufgenommen. Der Einsatz bestimmter Objektive ermöglichte die Aufnahme von Bildern durch den Boden der Zellkulturplatte.

3.7.2 Quantifizierung von Zellen und Fluoreszenz-Signalen

Die Quantifizierung der BrdU- und Myosin-positiven Zellen und der Zellkerne der C2C12 Kulturen wurde mit Hilfe der Metamorph Bildanalyse Software durchgeführt. Pro Zellkultur-Well wurden dafür 10 individuelle Bilder aus unterschiedlichen Regionen in 200-facher (200x) Vergrößerung aufgenommen. Im Falle der Myoblastenkulturen wurden 2 individuelle Bilder aus der mittleren Region jedes Klons in 100-facher Vergrößerung aufgenommen und die Auswertung manuell durchgeführt.

Die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität erfolgte ebenfalls mit Hilfe der

Metamorph Bildanalyse Software. Dazu wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des spezifischen Signals und des individuellen Hintergrunds pro Pixel ermittelt und voneinander subtrahiert.

3.7.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden der Wicoxon-Rangsummentest und der Brunner-Munzel-Test (auch: generalisierter Wilcoxon-Test) mit Hilfe des Programms "R" (www.r-project.org) durchgeführt. Diese nichtparametrischen Verfahren testen die Verteilung zweier Stichproben. Dabei werden die Rangwerte anstelle der Original-Messwerte verglichen. Dieser Test findet dann Anwendung, wenn Daten nicht normalverteilt sind. Der Brunner-Munzel-Test berücksichtigt zusätzlich stark divergierende Standardabweichungen zweier Stichproben.

Zum besseren Verständnis wurden die Statistiken als Säulendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen dargestellt. Signifikante Veränderungen (* $p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden im Diagramm gekennzeichnet. Die Anzahl der analysierten Proben und Individualexperimente sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der Differenzierung von C2C12 Zellen

Um einen ersten Einblick in die mögliche Rolle von Bmp-Signalen während der Differenzierung von Satellitenzellen zu bekommen, wurde zunächst die Differenzierung von C2C12 Zellen untersucht. Diese ursprünglich aus dem regenerierenden Muskel gewonnene, immortalisierte Zelllinie kann unter Serumreduktion in Myotuben, eine Vorstufe der Muskelfaser, differenziert werden (Blau et al., 1983). Sie stellt daher ein beliebtes Myoblastenmodell dar und wird zur Untersuchung der Muskelregeneration und -differenzierung verwendet. Da vorherige Untersuchungen bereits zeigten, dass C2C12 Zellen unter dem Einfluss von Bmps in Osteoblasten differenzieren können (Katagiri et al., 1997, 1994), sollte zunächst geprüft werden, ob sich diese Beobachtung reproduzieren lässt.

4.1.1 Bmp-Signale induzieren die Transdifferenzierung in Osteoblasten von C2C12 Zellen

Um einen Einfluss von Bmp-Signalen auf die Differenzierung von C2C12 Myoblasten zu untersuchen, wurden diese für drei Tage differenziert und mit Bmp7 und dem Bmp-Inhibitor Noggin behandelt. Da bekannt ist, dass C2C12 Zellen unter dem Einfluss von Bmp-Signalen in Osteoblasten transdifferenzieren, wurde zunächst die Expression von Alkalischer Phosphatase, einem frühen Osteoblastenmarker, mit Hilfe eines Enzymaktivitätstest untersucht (Abbildung 5).

Drei Tage nach Induktion der Differenzierung durch ein Herabsetzen der Serumkonzentration konnte festgestellt werden, dass in den Bmp7-behandelten Kulturen dass ein Teil der konfluenten Zellen Alkalische Phosphatase exprimiert (Abb. 5b). Es konnte jedoch in einem erheblichen Anteil der Zellen keine Expression von Alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden. Unbehandelte Kulturen zeigten nur vereinzelt die Expression von Alkalischer Phosphatase (Abb. 5a), was auf Bmps aus dem Zellkulturserum zurückgeführt werden kann. Unter der Behandlung mit dem Bmp-Inhibitor Noggin (Abb. 5c), konnten keine Alkalische Phosphatase exprimierende Osteoblasten detektiert werden.

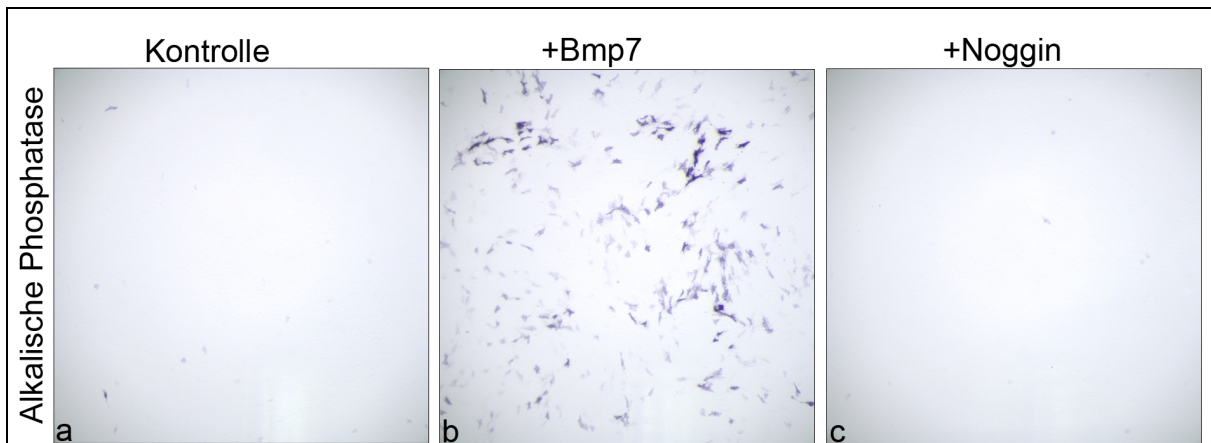


Abbildung 5: Bmp-Signale induzieren die Transdifferenzierung von C2C12 Zellen in Osteoblasten. Nachweis der Enzymaktivität von osteoblasten-spezifischer Alkalischer Phosphatase. C2C12 Zellen wurden differenziert und mit Bmp7 (b) oder Noggin (c) behandelt. Die Kontrolle (a) blieb unbehandelt. Noggin- (c) und unbehandelte Zellen (a) exprimieren keine Alkalische Phosphatase, während ein Teil der Bmp7-behandelten Zellen deutliche Enzymaktivität zeigt (b). 50x Vergrößerung.

Diese Analyse lässt den Schluss zu, dass eine Transdifferenzierung von C2C12-Zellen in Osteoblasten unter der Behandlung mit Bmp7 nicht obligatorisch ist.

4.1.2 Die Inhibition von Bmp-Signalen induziert die terminale Muskeldifferenzierung von C2C12 Zellen

Da nur ein Teil der Bmp-behandelten Zellen den frühen Osteoblastenmarker Alkalische Phosphatase exprimierten, sollten nun die Auswirkungen von Bmp-Signalen auf die terminale, myogene Differenzierung von C2C12 Zellen untersucht werden (Abbildung 6). Die Zellen wurden wie in 4.1.1 differenziert und behandelt. Der Nachweis terminal differenzierter Myoblasten erfolgte mit Hilfe des Antikörpers A4.1025, der alle Formen der schweren Kette der Skelettmuskelmyosine (MHC-myosin heavy chain) erkennt (Abb. 6a-c). In unbehandelten Kulturen von C2C12 Zellen exprimieren 5% der Zellen MHC. Die MHC-positiven Myoblasten zeigten außerdem die Bildung sogenannter Myotuben, die durch die Fusion einzelner, terminal differenzierter Myoblasten zustande kommt (Abb. 6a). Unter dem Einfluss von Bmp7 hingegen wurde in nur 0,5% aller Zellen MHC exprimiert (Abb. 6b). Die Bildung von Myotuben konnte nicht detektiert werden. Wurde während der Differenzierung hingegen mit dem Bmp-Inhibitor Noggin behandelt, so zeigte sich die

Expression von MHC in 8% der C2C12 Zellen und die Bildung von Myotuben war deutlich erkennbar (Abb. 6c).

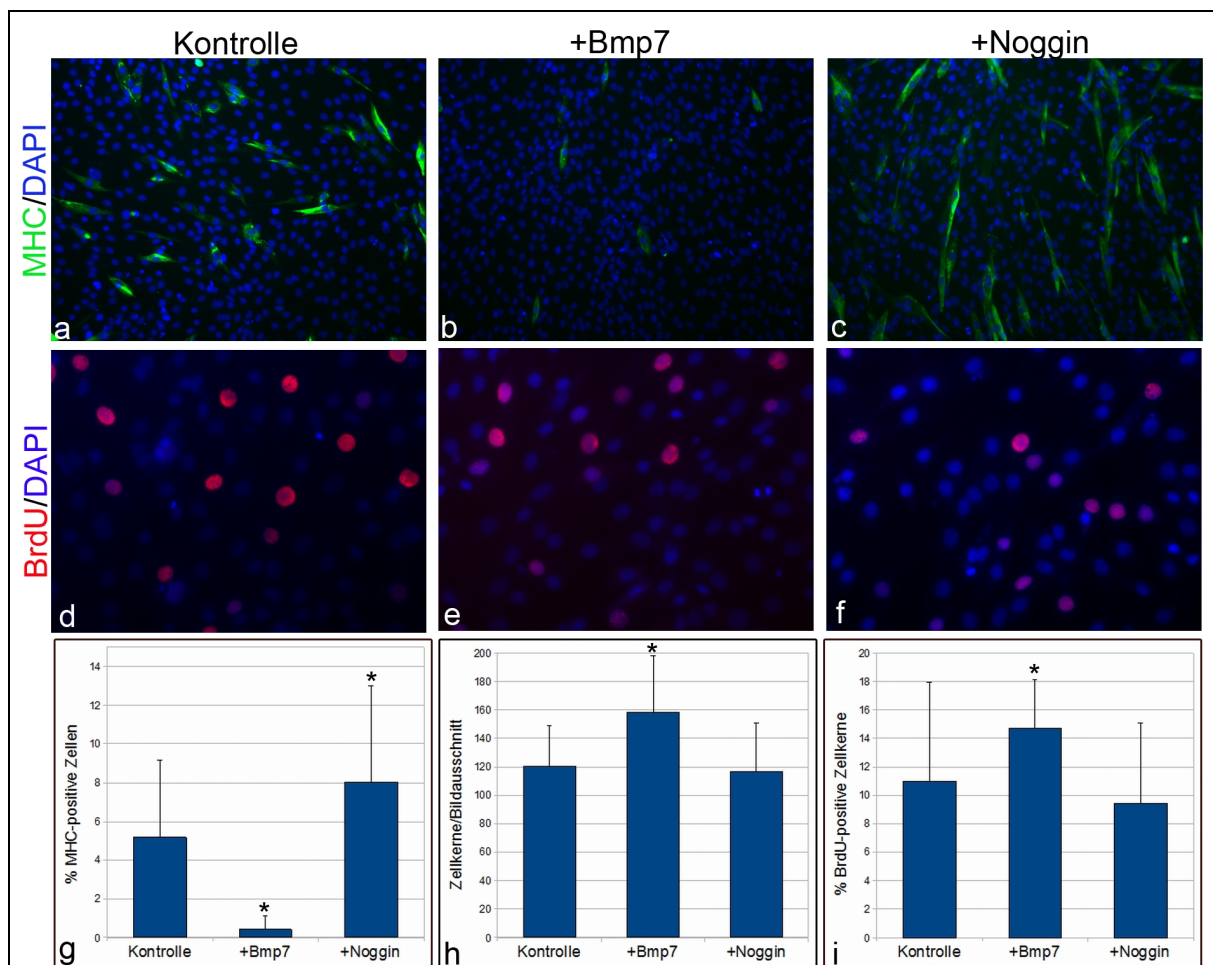


Abbildung 6: Bmp-Signale inhibieren die terminale Differenzierung von C2C12 Zellen. Nachweis der MHC Expression (a-c) und der BrdU Inkorporation (d-f) in C2C12 Zellen. Die Zellen wurden differenziert und mit Bmp7 (b und e) oder Noggin (c und f) behandelt. Die Kontrolle (a und d) blieb unbehandelt. (a-c) Die Bmp7-Behandlung inhibiert die terminale Differenzierung (b), während die Inhibition der Signale mit Noggin (c) zu einer Verstärkung des Effekts im Vergleich zur Kontrolle (a) führt. (g) Die Anzahl der MHC-positiven Zellen ist nach Bmp7-Behandlung signifikant reduziert (* $p < 0,005$; generalisierter Wilcoxon-Test) und ist in Noggin-behandelten Kulturen erhöht ($p < 0,005$; Wilcoxon-Test). (h) Die Anzahl der Zellkerne ist nach Bmp-Behandlung signifikant erhöht ($p < 0,005$; Wilcoxon-Test) und die relative Anzahl BrdU-positiver Zellkerne zeigt eine signifikant gesteigerte Proliferation nach Bmp7-Behandlung (e), während eine leichte Abnahme der Proliferationsrate nach der Behandlung mit Noggin (f) im Vergleich zur Kontrolle (d) festzustellen ist (i). (g-i) $n=6$ aus 2 individuellen Experimenten. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. (a-c) 100x Vergrößerung. (d-f) 200x Vergrößerung.

Die statistische Evaluation der relativen Anzahl von MHC-positiven Zellen ergab, dass die Behandlung mit Bmp7 die myogene Differenzierung signifikant reduziert ($p < 0,005$), während die Inhibition von Bmp-Signalen durch Noggin die myogene Differenzierung im Vergleich zu unbehandelten Kulturen signifikant verstärkt ($p < 0,005$; Abb. 6g).

Des Weiteren wurde bei der Quantifizierung festgestellt, dass die absolute Anzahl der Zellen in den Bmp7-behandelten Kulturen signifikant um 30% gegenüber der Kontrolle und der Noggin-behandelten Kulturen erhöht war ($p < 0,005$; Abb. 6h).

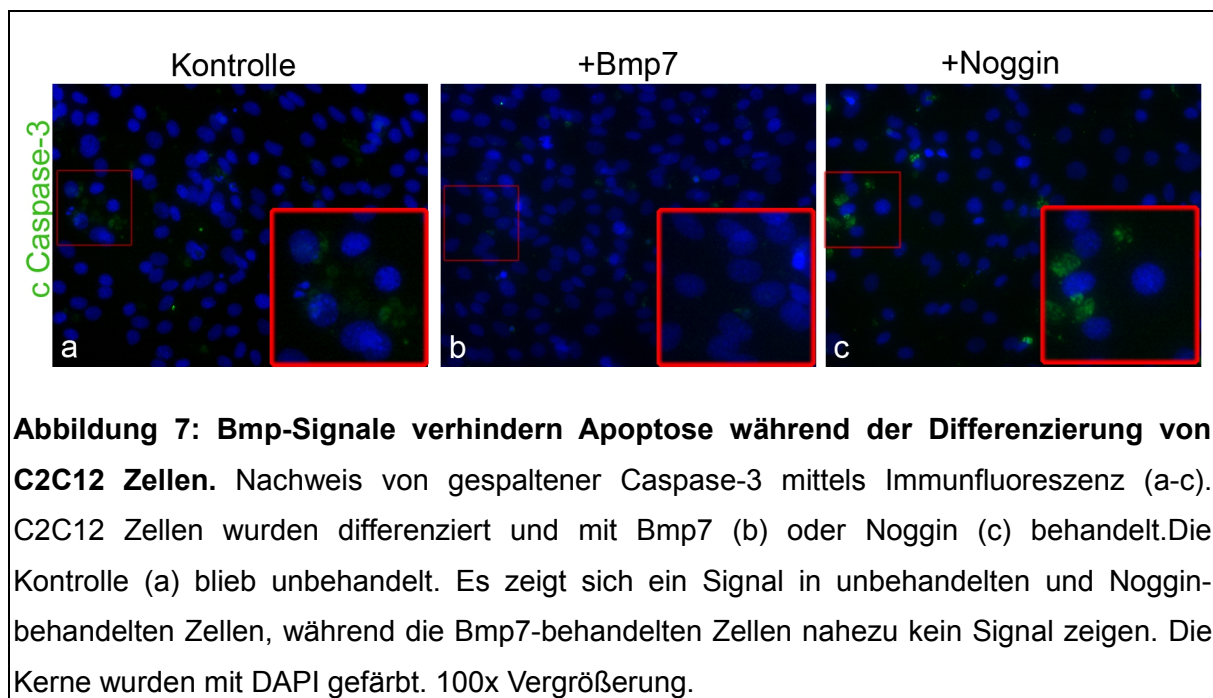
Um zu testen, ob die erhöhte Zellzahl durch eine gesteigerte Proliferation verursacht wird, wurde die Inkorporation von BrdU in differenzierenden C2C12-Kulturen untersucht (Abb. 6d-f). Dieses Thymidinanalogon wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut, und ist folglich ein Nachweis für aktiv proliferierende Zellen. verglichen mit unbehandelten (Abb. 6d) und Noggin-behandelten Zellen (Abb. 6f), zeigten Bmp7-behandelte Zellen (Abb. 6e) eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate ($p < 0,005$; Abb. 6i).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Bmp-Signale die Proliferation stimulieren, während der Verlust von Bmp-Signalen den Austritt aus dem Zellzyklus verstärkt und somit die terminale Differenzierung fördert.

4.1.3 Bmp-Signale sind ausreichend um den programmierten Zelltod während der Differenzierung von C2C12 Zellen zu verhindern

Aus vorherigen Untersuchungen ging hervor, dass die Induktion der Differenzierung von C2C12 Zellen durch ein Herabsetzen der Serumkonzentration, in einem Teil der Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren, während die anderen Zellen nach und nach aus dem Zellzyklus austreten und in Myotuben differenzieren (J. Wang and Walsh, 1996). Sowohl in unbehandelten Kulturen als auch in Noggin-behandelten Kulturen lösten sich die Zellen vom Kulturgefäß während der Differenzierung ab. Diese Beobachtung konnte in Bmp7-behandelte Kulturen nicht gemacht werden. Gespaltener Caspase-3 (c Caspase-3 = cleaved Caspase-3) ist eine Protease, die am Apoptoseprozess beteiligt ist (Abbildung 7) (J. Wang and Walsh, 1996; Tewari et al., 1995). Der Nachweis mittels Antikörper gegen gespaltene Caspase-3 bestätigte die Anwesenheit apoptotischer Zellen in unbehandelten Zellen und nach Noggin-Behandlung (Abb. 7a und c). Die Stimulation der C2C12-Zellen mit

Bmp7 verhinderte trotz der höheren Zelldichte das Auftreten c Caspase-3-positiver Zellen (Abb. 7b).



Zusammengefasst lassen die Untersuchungen der C2C12 Zellen darauf schließen, dass Bmp-Signale die Proliferation stimulieren und die Zellen vor dem programmierten Zelltod schützen.

4.2 Analyse des Bmp-Signalwegs in primären Satellitenzellen

Die ersten Versuche an C2C12 Zellen zeigten einen deutlichen Effekt von Bmp-Signalen auf die Differenzierung der Myoblasten. Es stellte sich nun die Frage, ob auch primäre Satellitenzellen, die aus der Muskulatur von Mäusen gewonnen werden, auf Bmp-Signale reagieren.

4.2.1 Primäre Satellitenzellen reagieren auf Bmp-Signale in *ex vivo* Kulturen

Ein System, welches sich zur Analyse der frühen Stadien der Satellitenzellentwicklung eignet, ist die *ex vivo* Kultivierung der Satellitenzellen auf der Muskelfaser. Dazu wurden einzelne Muskelfasern mit den sich auf ihrer

Oberfläche befindenden Satellitenzellen aus dem *Musculus Extensor digitorum longus* (EDL) isoliert. Im Unterschied zu C2C12 Zellen verhalten sich diese Zellen wie Stammzellen und sind zur Zeit der Isolierung in einem Ruhezustand. Sie können durch Kultivierung in einem speziellen Kulturmedium, welches Hühner-Embryo-Extrakt als natürliche Quelle von Wachstumsfaktoren enthält, aktiviert werden. In diesem System kann eine Expressionsanalyse bestimmter Satellitenzellmarker zur Einstufung der Satellitenzellen in verschiedene Entwicklungsstadien genutzt werden (Abbildung 8). Die Analyse des Bmp-Signalwegs erfolgte parallel dazu (Abbildung 9). Die Satellitenzellen wurden für 0, 24, 48 und 72 Stunden auf der Muskelfaser kultiviert und mittels Immunfluoreszenz analysiert.

In ruhenden Satellitenzellen ($t = 0$ h; Abb. 8a-d) wird der Transkriptionsfaktor Pax7 exprimiert, während MyoD, ein Marker für aktivierte, proliferierende und differenzierende Satellitenzellen, nicht nachgewiesen werden kann. Nach 24 Stunden in Kultur ($t = 24$ h; Abb. 8e-h), einem Zeitpunkt an dem sich die Mehrheit der Satellitenzellen noch nicht geteilt haben, sind die Transkriptionsfaktoren Pax7 und MyoD in Satellitenzellen koexprimiert und die Signale im Kern lokalisiert. Nach 48 Stunden ($t = 48$ h; Abb. 8i-p), haben die Satellitenzellen Myoblasten hervorgebracht, die die Transkriptionsfaktoren Pax7 und MyoD exprimieren, während die Expression des frühen Differenzierungsmarkers Myogenin noch nicht detektiert werden kann. Nach 72 Stunden hingegen ($t = 72$ h; Abb. 8q-t) ist die Expression von Myogenin deutlich in einer Vielzahl der MyoD-positiven Myoblasten zu erkennen.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass unter den gewählten Kulturbedingungen die Expression spezifischer Marker zeitlich koordiniert erfolgt. Sie können somit zur Einstufung der Satellitenzellen in ruhende, aktivierte, proliferierende und frühe differenzierende Zellen verwendet werden.

Um festzustellen, ob und wann Bmp-Signale aus dem Kultumedium auf Satellitenzellen wirken, wurden die kultivierten Satellitenzellen auf das Vorhandensein von phospho-Smad 1/5/8 untersucht. Die Phosphorylierung der Smad-Proteine erfolgt spezifisch durch die Bindung von Bmps an die Bmp-Rezeptoren und ist somit ein direkter Nachweis für den aktivierten Bmp-Signalweg.

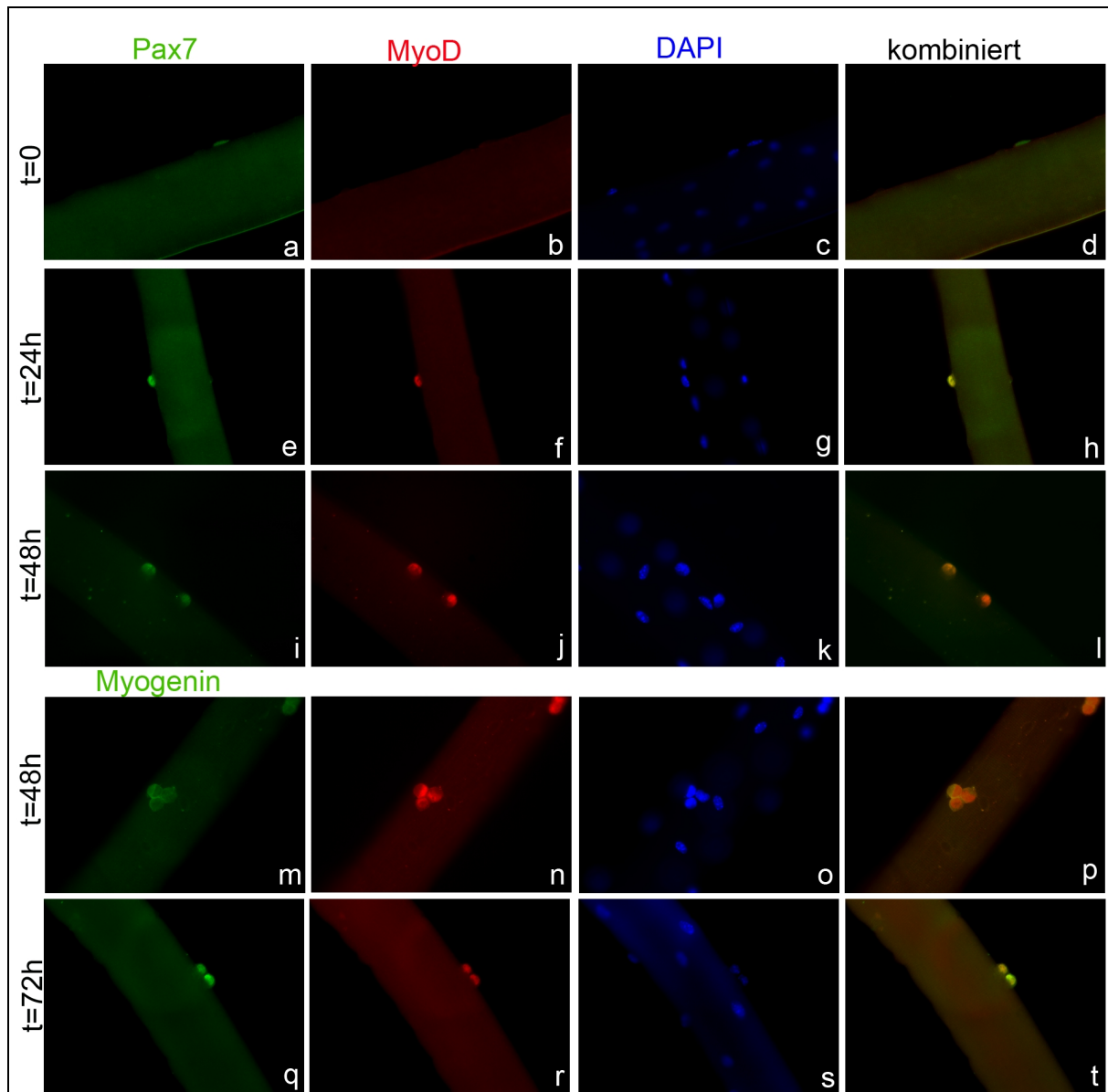


Abbildung 8: Zeitabhängige Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren in kultivierten Satellitenzellen. Satellitenzellen wurden auf der Faser für 0 (a-d), 24 (e-h), 48 (i-p) und 72 Stunden (q-t) kultiviert und mittels Doppel-Immunfluoreszenz auf die Expression von Pax7 (a, e, i), Myogenin (m und q) und MyoD (b, f, j, n, r) untersucht. (a-d) Ruhende Satellitenzellen exprimieren ausschließlich Pax7. (e-h) Nach 24 Stunden kann die Expression von MyoD parallel zu Pax7 festgestellt werden. (i-l) Nach 48 Stunden werden Pax7 und MyoD koexprimiert, während die Expression von Myogenin (m-p) nicht detektiert werden kann. (q-t) Die Expression von Myogenin kann nach 72 Stunden parallel zu MyoD festgestellt werden. Die Färbung der Kerne erfolgte mit DAPI. 400x Vergrößerung.

Auf frisch isolierten Muskelfasern konnte p-Smad in den Pax7-positiven, ruhenden Satellitenzellen oder in den Kernen der Muskelfaser nicht nachgewiesen werden (t=0h; Abb. 9a-d). Nach 24 Stunden in Kultur zeigen die aktivierten, Pax7-positiven Satellitenzellen ein klares, kernlokalisierendes p-Smad Signal, wahrscheinlich bedingt durch die Stimulation mit Bmps aus dem Kulturmedium (t=24h; Abb. 9e-h).

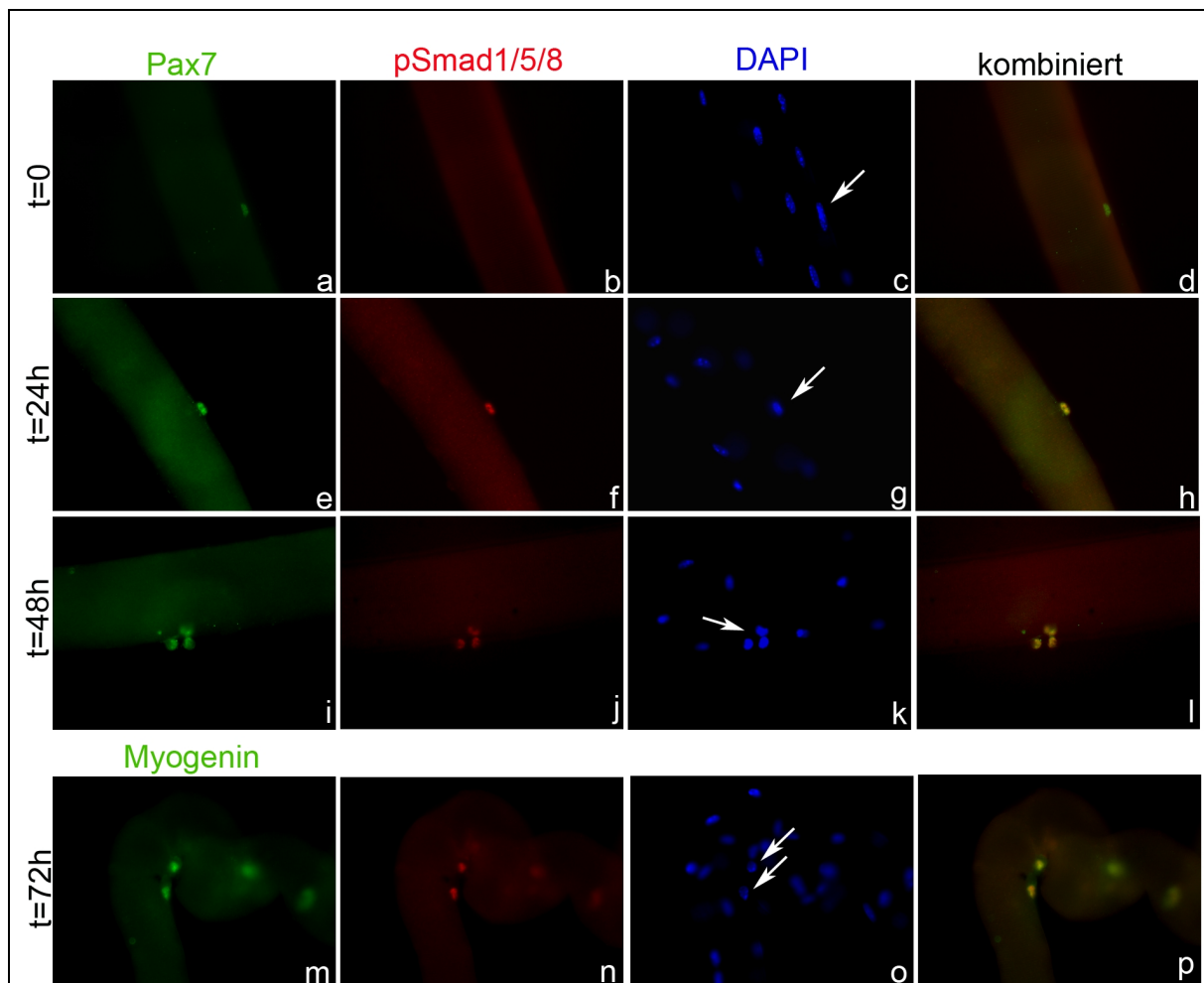


Abbildung 5: Aktivierte Satellitenzellen reagieren auf Bmp-Signale. Satellitenzellen wurden auf der Muskelfaser für 0 (a-d), 24 (e-h), 48 (i-l) und 72 Stunden (m-p) kultiviert und mittels Doppel-Immunfluoreszenz auf die Expression von Pax7 (a, e, i), Myogenin (m) und p-Smad (b, f, j, n) untersucht. (a-d) In ruhenden Satellitenzellen ist p-Smad nicht detektierbar. (e-h) Nach 24 Stunden in Kultur ist p-Smad deutlich parallel zu Pax7 erkennbar. (i-l) Nach 48 Stunden ist p-Smad in den proliferierenden Satellitenzellen detektierbar. (m-p) Nach 72 Stunden ist p-Smad parallel zu Myogenin nachweisbar. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. 400x Vergrößerung.

Dieses bleibt in den proliferierenden Satellitenzellen erhalten (t=48h; Abb. 9i-l). Nach 72 Stunden, wenn die Satellitenzellen beginnen Myogenin zu exprimieren, bleibt das p-Smad Signal nukleär in diesen Zellen erhalten (t=72h; Abb. 9m-p). Die Zellkerne der Muskelfaser hingegen zeigen zu keiner Zeit eine erkennbare Phosphorylierung der Smad-Proteine.

Zusammengefasst lässt sich aus diesem Ergebnis schließen, dass der Bmp-Signalweg in ruhenden Satellitenzellen nicht aktiv ist, es jedoch während der Kultivierung *ex vivo* zu einer deutlichen Aktivierung des Bmp-Signalwegs in den Satellitenzellen kommt. Während der Proliferationsphase bleibt der Signalweg in den Satellitenzellen aktiv. Des Weiteren wird deutlich, dass parallel zum aktivierten Bmp-Signalweg die Einleitung der Differenzierung stattfindet.

4.2.2 Direkter Effekt von Bmp-Signalen auf Satellitenzellen

Während der Kultivierung von Satellitenzellen werden diese durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren aus dem Kulturmedium stimuliert. Es stellte sich nun die Frage, ob die Stimulation des Bmp-Signalwegs in Satellitenzellen direkt möglich ist oder ob eventuell die Signale anderer Wachstumsfaktoren aus dem Kulturmedium benötigt werden, um eine Reaktion auf Bmp-Signale zu ermöglichen. Die Satellitenzellen wurden dazu auf Muskelfasern unter serumfreien Bedingungen für 18 Stunden kultiviert und mit Bmp7 stimuliert (Abbildung 10). Zur Kontrolle wurde ein Teil der Einzelfasern wie in 4.2.1 unter Standardbedingungen kultiviert. Die Satellitenzellen wurden anschließend auf die Expression des Satellitenzellmarkers Pax7 und der aktivierten Mediatoren des Bmp-Signalwegs p-Smad untersucht.

Nach 18 Stunden in Kultur zeigen sich in Satellitenzellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden Pax7-, p-Smad-positive Satellitenzellen (Abb. 10a-d). Ebenso konnten p-Smad positive Satellitenzellen auf Fasern detektiert werden, die in serumfreien Medium kultiviert und mit Bmp7 stimuliert wurden (Abb. 10i-l). Die Satellitenzellen, die unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden, zeigten dagegen keine Aktivierung des Bmp-Signalwegs (Abb. 10e-h). Zusätzlich wurde ausschließlich in den Bmp7-stimulierten Kulturen in einigen Muskelfasern ein sehr schwaches p-Smad Signal in den Myonuklei detektiert (gelber Pfeil in 10j und k).

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass Satellitenzellen nach der Isolierung aus dem Muskel direkt auf Bmps reagieren können. Zusätzlich kann ausgeschlossen werden,

dass endogen exprimierte Bmps in ausreichender Menge von Satellitenzellen oder Muskelfasern unter serumfreien Bedingungen produziert werden, um die Aktivierung des Bmp-Signalweg zu stimulieren.

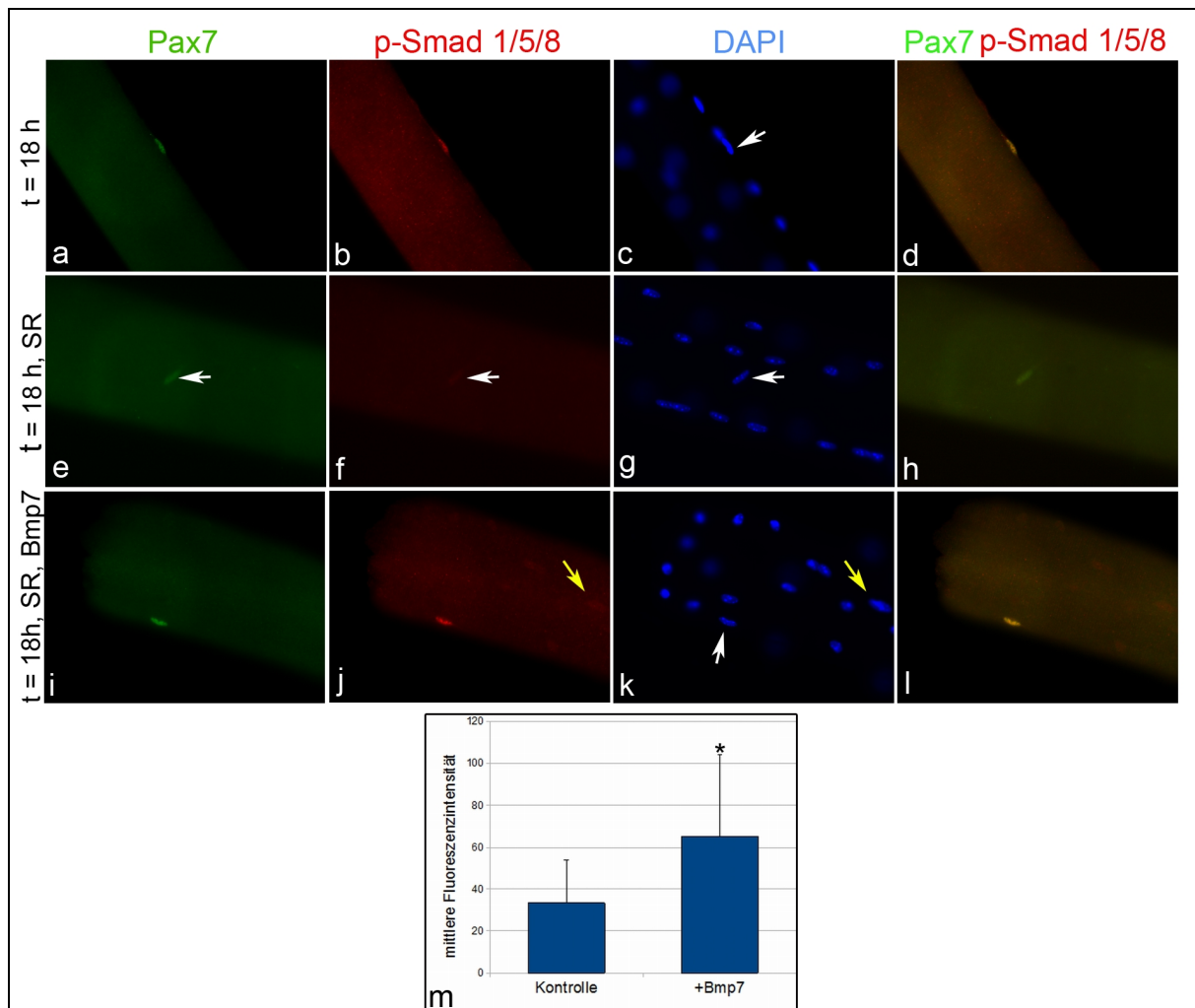


Abbildung 10: Satellitenzellen reagieren direkt auf Bmp-Signale. Satellitenzellen wurden auf der Faser unter Standard- (a-d) oder serumfreien Bedingungen (e-l) kultiviert. Die kultivierten Satellitenzellen blieben unbehandelt (a-d und e-h) oder wurden mit Bmp7 behandelt (i-l). Der Nachweis von Pax7 und p-Smad mittels Immunfluoreszenz zeigt p-Smad in Pax7-positiven Satellitenzellen nach Kultivierung unter Standardbedingungen (a-d) und in serumfreien Kulturen nach Bmp7-Behandlung (i-l). Es können keine p-Smad Signale in serumfreien Kulturen festgestellt werden; ebenso ist die Expression von Pax7 geschwächt. 400x Vergrößerung. (m) Die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des Pax7 Signals zeigt, dass nach Bmp7-Stimulation die Pax7-Expression signifikant aufrecht erhalten wird (n=30 behandelte und unbehandelte Satellitenzellen aus 3 individuellen Experimenten; *p<0,005; Wilcoxon-Test).

4.2.3 Aufrechterhaltung der Pax7 Expression nach Stimulation mit Bmp7

Überraschenderweise zeigte sich bei der Analyse der Bmp-Signalweg-Aktivierung ein weiterer Effekt von Bmp7 auf Satellitenzellen. Die Expression von Pax7 in Satellitenzellen war in serumfreien Kulturen (weißer Pfeil in Abb. 10e) deutlich schwächer als in denen, die zusätzlich mit Bmp7 stimuliert wurden (Abb. 10i) oder nach Kultivierung unter Standardbedingungen (Abb. 10a). Die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität zeigte dabei eine signifikante Schwächung des Pax7-Signals um 50% (Abb. 6m).

Daraus lässt sich schließen, dass unter serumfreien Bedingungen Bmp-Signale ausreichen um die Expression von Pax7 aufrecht zu erhalten.

4.2.4 Bmp-Signale induzieren keine Transdifferenzierung in Myoblasten

4.2.4.a Etablierung reiner Satellitenzellkulturen

Die Voranalyse an C2C12 Zellen zeigte einen deutlichen Effekt von Bmp-Signalen auf die terminale Differenzierung der Myoblasten. Um zu testen, ob Bmp-Signale die Differenzierung von *ex vivo* kultivierten Satellitenzellen in der gleichen Weise beeinflussen, wurde zunächst ein Kultursystem etabliert, welches es ermöglicht reine Myoblastenpopulationen zu untersuchen, die die Kompetenz besitzen in Myotuben zu fusionieren (Abbildung 11). Die Kultivierung von Satellitenzellen auf der Muskelfaser eignet sich dazu nicht, da eine Fusion der Myoblasten mit der Muskelfaser nicht stattfindet (Rosenblatt et al., 1995).

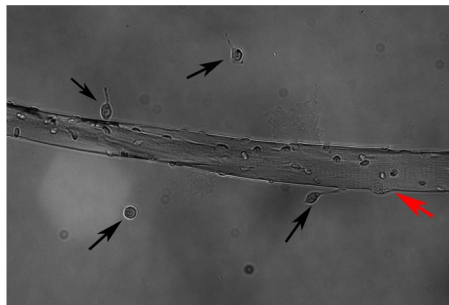


Abbildung 11: Satellitenzellen migrieren auf einem Kultursubstrat von der Faser weg. Einen Tag nach Isolation aus dem Muskel wurde die Muskelfaser (roter Pfeil) auf Matrigel adheriert. Nach weiteren 24 Stunden haben einzelne Satellitenzellen (schwarze Pfeile) die Faser verlassen und verweilen auf dem Kultursubstrat. 100x Vergrößerung.

Dazu wurden einzelne Fasern auf einem Kultursubstrat (Matrigel) adhärirt. Die Satellitenzellen migrieren dann auf dem Kultursubstrat und verlassen die Muskelfaser, welche sich meist nach einigen Tagen in Kultur vom Substrat löst. Es ist dann möglich, die reine Population von Satellitenzellen zu expandieren und durch die Einschränkung von Wachstumsfaktoren zu differenzieren.

Die auf diese Art kultivierten Satellitenzellklone sind uniform in ihrer Erscheinung. Alle untersuchten Kulturen zeigten die Expression satellitenzell- und muskel-spezifischer Marker (vgl. Abb. 13a, d, g), weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um reine Populationen von Myoblasten handelt.

4.2.4.b Bmp-Signale induzieren keine Transdifferenzierung von primären Satellitenzellen in Osteoblasten

Da ein Teil der in 4.1 untersuchten C2C12 Zellen durch Bmp7-Stimulation in Osteoblasten transdifferenzierte, sollten die Satellitenzellkulturen nach drei Tagen Differenzierung zunächst auf die Expression von Alkalischer Phosphatase untersucht werden (Abbildung 12).

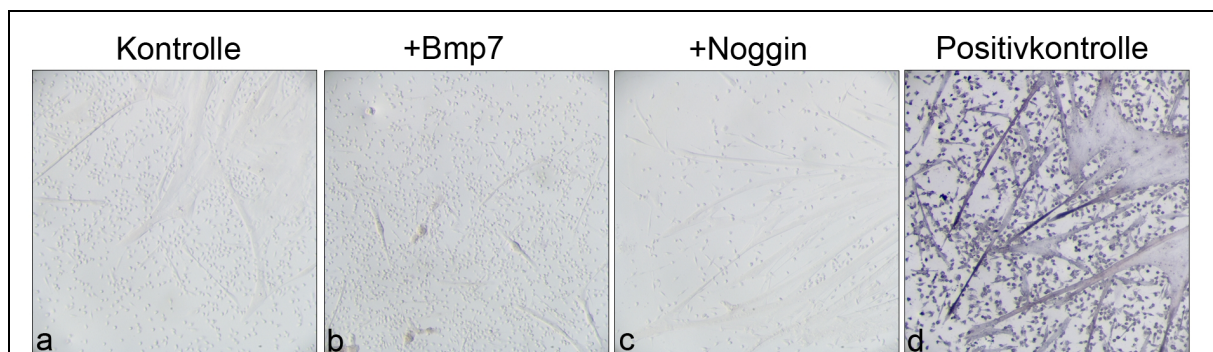


Abbildung 12: Primäre Myoblasten zeigen keine Transdifferenzierung in Osteoblasten nach Bmp7-Behandlung. Nachweis der enzymatischen Aktivität von Alkalischer Phosphatase nach dreitägiger Differenzierung und Bmp7- (b) oder Noggin-Behandlung (c). Die Kontrolle (a) blieb unbehandelt. Die Positivkontrolle (d) wurde mit einem Alkalische Phosphatase-Fgf8 Fusionsprotein vorinkubiert.

Nach dreitägiger Differenzierung zeigten keine der analysierten Kulturen die Expression von Alkalischer Phosphatase (Abb. 12a-c). Aufgrund dessen konnte

ausgeschlossen werden, dass unter diesen Kulturbedingungen primäre Myoblasten in Osteoblasten zu transdifferenzieren.

4.2.5 Die Inhibition von Bmp-Signalen induziert die terminale Differenzierung von Myoblasten

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Inhibition von Bmp-Signalen die terminale Differenzierung von C2C12 Zellen deutlich stimulierte (vgl. 4.1). In primären Kulturen von Satellitenzellen konnte jedoch die Expression des frühen Differenzierungsmarkers Myogenin parallel zum aktivierten Bmp-Signalweg festgestellt werden (vgl. 4.2.1). Es sollte daher herausgefunden werden ob Bmp-Signale einen Einfluss auf die Festlegung zu Differenzieren oder auf die terminale Differenzierung von Myoblasten nehmen. Dazu wurde die Expression von Myogenin in den Myoblastenkulturen untersucht werden. Die Expression von Myogenin legt die Zellen darauf fest zu differenzieren und nach Abschluss der Zellteilung aus dem Zellzyklus auszutreten. Da neben Satellitenzellen auch verschiedene andere Zelltypen in der adulten Muskulatur vorkommen, wurden die Kulturen parallel auf die Expression von Desmin, einem muskel-spezifischen Intermediärfilament Protein, untersucht. Damit können sich Kontaminationen mit anderen Zellen, die in der Muskulatur vorkommen, wie z.B. Fibroblasten oder Endothelzellen, ausschließen lassen. Die Kulturen wurden für diese Analyse für drei Tage durch Herabsetzen der Serumkonzentration differenziert und mittels Immunfluoreszenz auf die Expression von Myogenin und Desmin untersucht (Abbildung 13).

Alle Zellen in den behandelten und unbehandelten Kulturen zeigten die Expression von Desmin, was eindeutig zeigt, dass es sich um eine reine Populationen myogener Zellen handelt. Die Expression von Myogenin konnte ebenfalls in allen behandelten und unbehandelten Kulturen festgestellt werden. Die Analyse der Desmin-Expression ermöglichte es außerdem die Zellen in fusionierte und einzellige Myoblasten zu unterteilen. Gemeinsam mit der Myogenin-Expression lassen sich die Zellen in den Kulturen in drei Kategorien einteilen: proliferierende Myoblasten (einkernige Myoblasten, Myogenin-negativ), früh differenzierende Myoblasten (einkernige Myoblasten, Myogenin-positiv) und terminal differenzierte Myoblasten (mehrkernige Myotuben, Myogenin-positiv und -negativ).

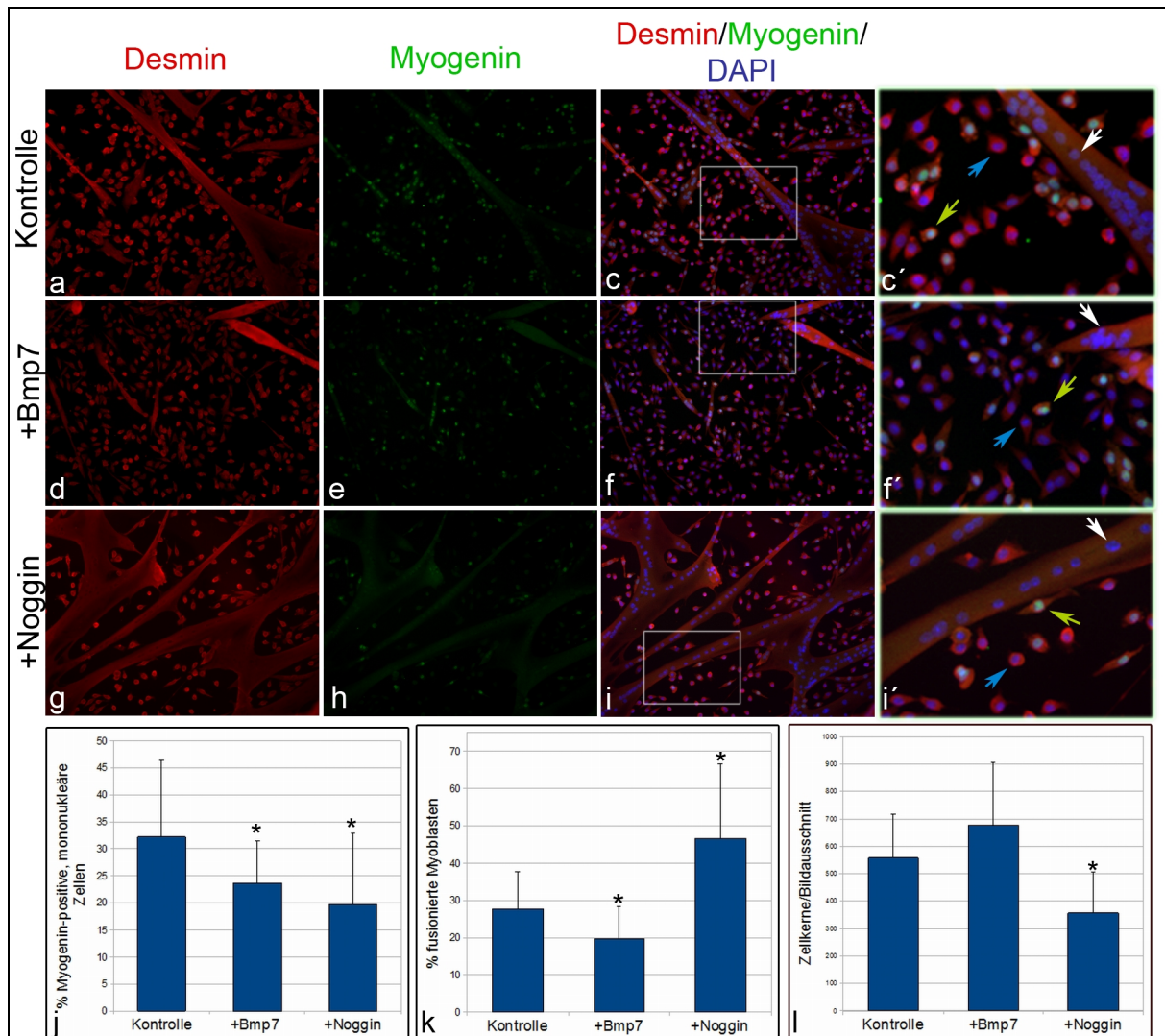


Abbildung 13: Bmp-Signale regulieren die Differenzierung von primären Myoblasten.

Myoblasten wurden mit Bmp7 (d-f) oder Noggin (g-i) während der dreitägigen Differenzierung behandelt. Die Kontrolle (a-c) blieb unbehandelt. Immunologischer Nachweis von Desmin (a, d, g) und Myogenin (b, e, h). Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (c, f, i). 100x Vergrößerung. Die eingerahmten Ausschnitte in c, f und i sind in c', f' und i' vergrößert. Alle Myoblasten/Myotuben exprimieren Desmin. Drei unterschiedliche Myoblastentypen lassen sich feststellen: zu Myotuben fusionierte Myoblasten (weißer Pfeil in c', f' und i'), einzellige, Myogenin-negative Myoblasten (blauer Pfeil in c', f' und i') und einzellige, Myogenin-positive Myoblasten (gelber Pfeil in c', f' und i'). (j) Die statistische Auswertung zeigt eine signifikante Reduzierung der einzelligen, Myogenin-positiven Myoblasten nach Behandlung mit Bmp7 ($p < 0,005$) und nach Behandlung mit Noggin ($p = 0,05$) ($n \geq 6$). (k) Die Anzahl der fusionierten Myoblasten ist nach Bmp7-Behandlung signifikant reduziert ($p < 0,005$) und nach Noggin-Behandlung signifikant erhöht ($p < 0,005$) ($n \geq 13$). (l) Die Zellzahlen sind nach Noggin-Behandlung signifikant reduziert ($p < 0,005$) und nach Bmp7-Behandlung erhöht ($p = 0,052$) ($n \geq 13$). * $p < 0,05$; Wilcoxon-Test.

Um festzustellen, ob Bmp-Signale auf die frühe Expression von Myogenin Einfluss nehmen, wurde die Anzahl der früh differenzierenden Myoblasten in den behandelten und unbehandelten Kulturen quantifiziert (Abb. 13j).

In Bmp7-behandelten Kulturen ließ sich ein signifikant geringerer Anteil Myogenin-positiver Einzelzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 13j; $p < 0,05$) feststellen. In den Noggin-behandelten Kulturen zeigt sich wider Erwarten im Durchschnitt ebenfalls eine signifikante Reduktion des Anteils Myogenin-positiver Zellen innerhalb der Population mononukleärer Zellen (Abb. 13j; $p < 0,05$). Interessanterweise ergab die Quantifizierung der fusionierten Myoblasten, dass die 47% der Myoblasten in den Noggin behandelten Kulturen fusioniert waren, während nach der Behandlung Bmp7 nur 20% der Myoblasten im Vergleich 28% in der unbehandelten Kontrolle fusionierten. Diese Änderungen durch die Behandlung waren in beiden Fällen signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13k; $p < 0,05$). Des Weiteren konnte eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl um 36% in den Noggin-behandelten Kulturen im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden (Abb. 13l; $p < 0,005$). Nach Bmp7-Behandlung war die Gesamtzellzahl erhöht, die statistische Evaluation zeigte aber keine signifikante Änderung (Abb. 13l; $p = 0,052$).

Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass Bmp-Signale bereits die Festlegung zu differenzieren durch die Expression von Myogenin und die terminale Differenzierung inhibieren.

Die vorangegangene Analyse zeigte besonders deutliche Effekte durch die Inhibition der Bmp-Signale auf die Differenzierung der Zellen. Die Reduktion der Gesamtzellzahl ließ vermuten, dass die gesteigerte Differenzierung auf Kosten der Proliferation stattfindet.

4.2.6 Sekundäreffekte beeinflussen die Proliferation in Myoblastenkulturen

Um zu testen, ob Bmp-Signale die Zellen in einem proliferativen Zustand halten, während die Abwesenheit den Austritt aus dem Zellzyklus fördert, wurde die Inkorporation von BrdU in Myoblastenkulturen analysiert (Abbildung 14). Die parallele Analyse der MHC-Expression floss in die Quantifizierung der fusionierten Zellen und Zellkerne in 4.2.5 ein. Die Zugabe des BrdU zum Kulturmedium erfolgte zwei

Stunden vor Beendigung der dreitägigen Differenzierung und wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass keine der BrdU-positiven Zellen MHC exprimierte (Abb. 14 c'). Einige BrdU-positive Zellen konnten jedoch beobachtet werden, die sich auf den Myotuben befanden (Abb. 14i'). Dies konnte hauptsächlich dort beobachtet werden, wo Myoblasten große Myotuben gebildet hatten. Die Quantifizierung der BrdU-positiven Myoblasten ergab, dass, verglichen mit unbehandelten Myoblasten, die Noggin-Behandlung zu einer milden Reduzierung des Anteils BrdU-positiver Zellen innerhalb der Population mononukleärer, nicht differenzierter Zellen führt. Interessanterweise zeigten sich in den Bmp7-behandelten Kulturen nach drei Tagen Differenzierung ebenfalls eine geringere Anzahl BrdU-positiver Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen innerhalb der Population mononukleärer Zellen (Abb. 14j). Die statistische Analyse zeigte jedoch, dass diese Unterschiede nicht signifikant waren. Dieser Effekt lässt sich möglicherweise auf die hohe Zelldichte in den Bmp7-behandelten Kulturen und die damit verbundene Kontaktinhibition zurückführen.

In 4.2.5 wurde davon ausgegangen, dass die fusionierten Myoblasten die terminal differenzierte Population darstellen. Tatsächlich konnte jedoch die Expression von MHC, welches ausschließlich in terminal differenzierten Myoblasten exprimiert wird, in einem geringen Anteil von ca. 8-10% der mononukleären Myoblasten detektiert werden. Der relative Anteil MHC-positiver Einzelzellen innerhalb der gesamten Population mononukleärer Zellen war jedoch nach der Behandlung mit Bmp7 oder Noggin nicht signifikant verändert. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die geringe Anzahl fusionierter Myoblasten, die nach der Behandlung mit Bmp7 beobachtet wurden, nicht durch einen Defekt während des Fusionsprozesses zu Stande kommt.

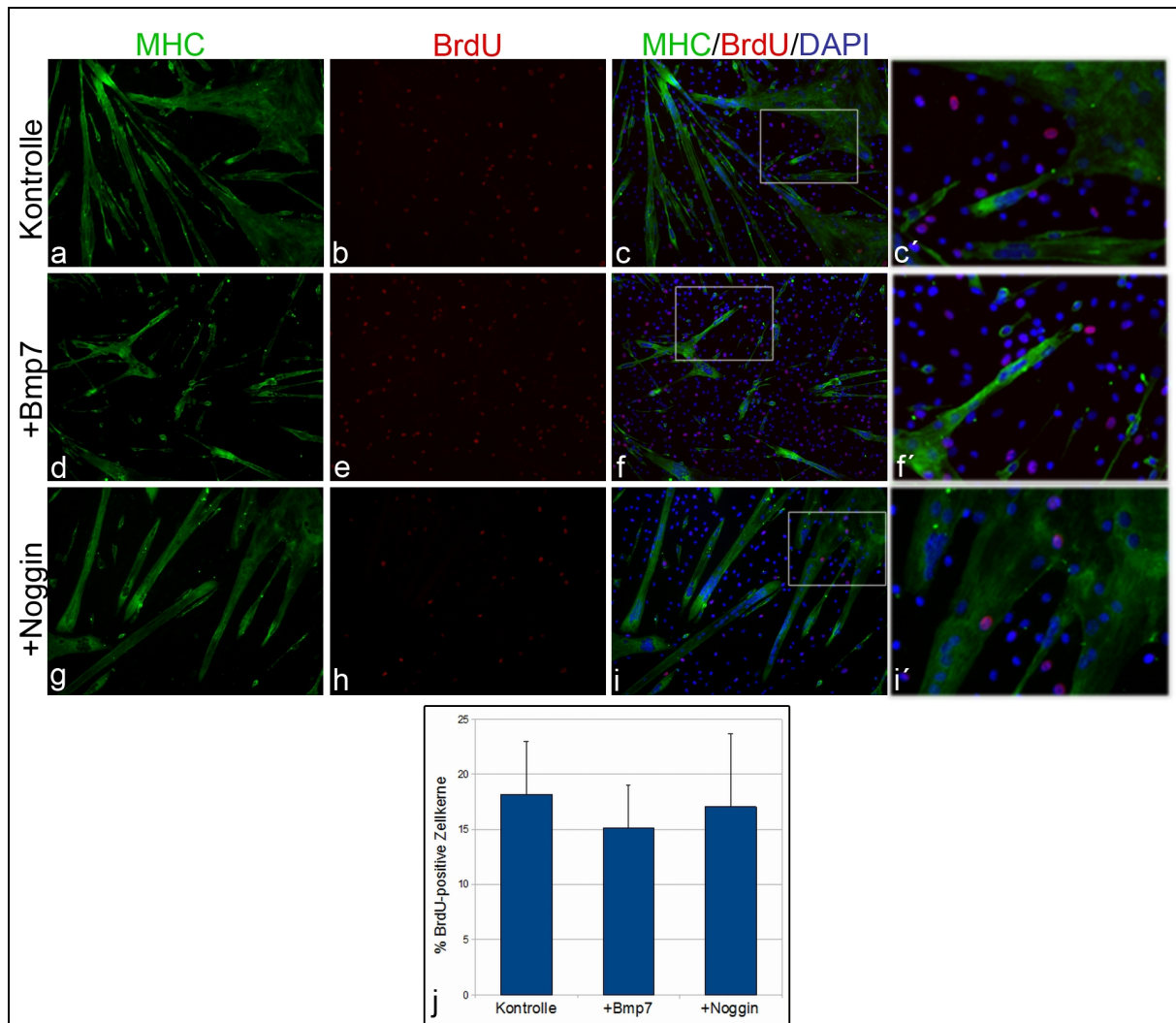


Abbildung 14: Veränderte Proliferationsraten nach BMP-Behandlung. Analyse der BrdU-Inkorporation (b, e, h) parallel zu MHC (a, d, g) nach drei Tagen Differenzierung und Bmp7- (d-f) oder Noggin-Behandlung (g-i). Die Kontrolle (a-c) blieb unbehandelt. Die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die eingerahmten Ausschnitte in c, f, i sind in c', f', i' vergrößert. Die statistische Analyse mittels Wilcoxon-Test zeigt keine signifikant geänderten Proliferationsraten nach Bmp7-Behandlung ($p=0,11$) oder nach Noggin-Behandlung ($p=0,66$) im Vergleich zur Kontrolle (j) ($n \geq 6$).

4.2.7 Die Inhibition von Bmp-Signalen induziert den Austritt aus dem Zellzyklus

Da die Untersuchung der BrdU-Inkorporation aufgrund sekundärer Effekte keinen eindeutigen Schluss auf den Einfluss von Bmp-Signalen auf die Proliferation zuließ, die Behandlung mit Noggin jedoch auf Grund der drastisch reduzierten Zellzahlen eine Verringerung der Proliferationsrate suggerierte, wurde ein "BrdU-pulse-chase" Experiment durchgeführt (Abbildung 15). Dazu wurden Satellitenzellklone zunächst wie gewohnt expandiert. Zwei Stunden bevor die Differenzierung induziert wurde, wurde BrdU zum Kulturmedium hinzugegeben (Abb. 15a). Die Myoblasten wurden anschließend differenziert und mit Noggin behandelt. Um zu bestimmen, welche Zellen während des Pulses BrdU inkorporiert haben und anschließend terminal differenzierten, wurden BrdU und MHC mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 15b-e).

Es zeigte sich, dass BrdU-positive Kerne in den MHC-positiven Myotuben von unbehandelten und Noggin-behandelten Kulturen vorhanden waren (Abb. 15b und e). In Noggin-behandelten Kulturen zeigten die Kerne, die BrdU inkorporiert hatten, eine stärkere Intensität des BrdU-Signals als die unbehandelten Kulturen. Um die Signalintensität zu quantifizieren, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der BrdU-positiven Kerne in MHC-positiven Myotuben bestimmt. Die mittlere Fluoreszenzintensität war in Noggin behandelten Kulturen deutlich erhöht und die Verteilung zeigte außerdem, dass mehr Zellen der Noggin-behandelten Kulturen hohe Konzentrationen von BrdU aufwiesen (Abb. 15f).

Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Zellen der Noggin-behandelten Kulturen nach der Inkorporation von BrdU früher aus dem Zellzyklus austraten, während es bei den unbehandelten Zellen durch fortschreitende Proliferation zu einer Verdünnung des inkorporierten BrdUs kam.

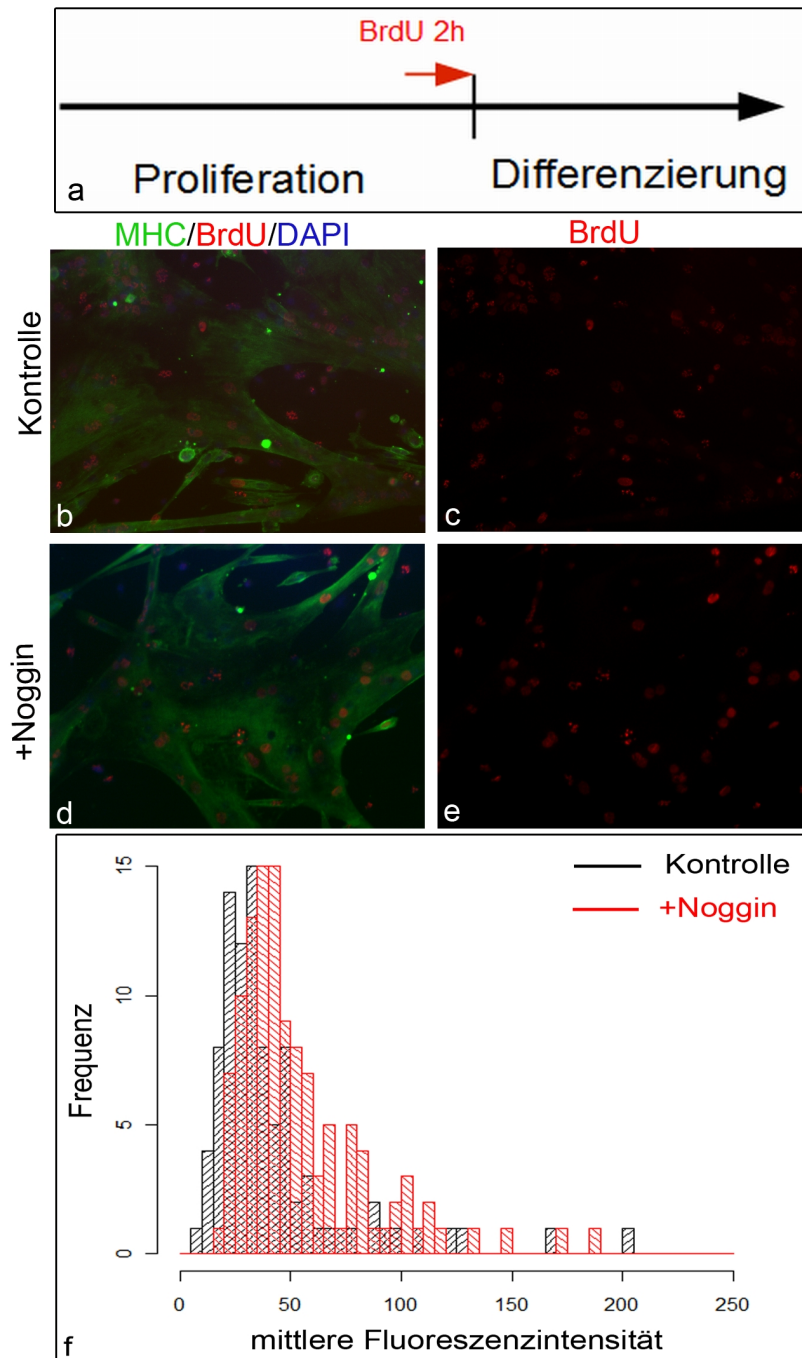


Abbildung 15: Die Inhibition von Bmp-Signalen induziert den Austritt aus dem Zellzyklus. Primäre Myoblasten wurden für zwei Stunden mit BrdU behandelt und anschließend differenziert (a). Die Zellen wurden mit Noggin behandelt (d und e) oder blieben unbehandelt (b und c). Der Nachweis von BrdU (c und e) und MHC (überlagerte Bilder b und d) erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. (f) Die Quantifizierung des BrdU-Fluoreszenzsignals zeigt eine signifikante Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Noggin behandelten Kulturen ($p < 0,005$; Wilcoxon-Test). Das Histogramm zeigt die Verschiebung zu höheren Intensitäten nach Noggin-Behandlung (rot; $n=92$) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz; $n=117$).

4.2.8 Fusionierte Myoblasten zeigen eine abgeschwächte Reaktivität gegenüber Bmp-Signalen

Die bisherige Analyse zeigte deutlich, dass Bmp-Signale die Differenzierung von Myoblasten maßgeblich beeinflussen können. Aufgrund der Beobachtung, dass die Zellkerne der Muskelfaser auch nach Bmp-Behandlung p-Smad-negativ blieben, stellte sich die Frage, ob und wann die Fähigkeit auf Bmp-Signale zu reagieren verloren geht. Dazu wurden wiederum die Differenzierung adhärenter Kulturen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert und p-Smad mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 16).

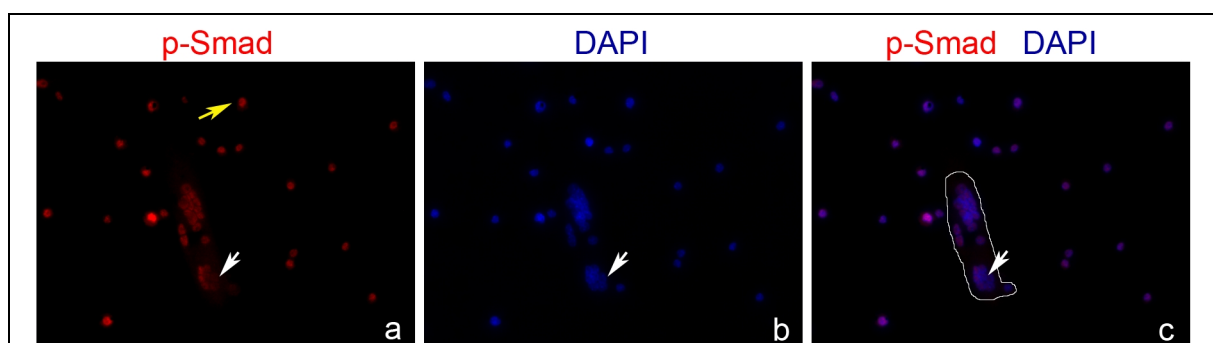


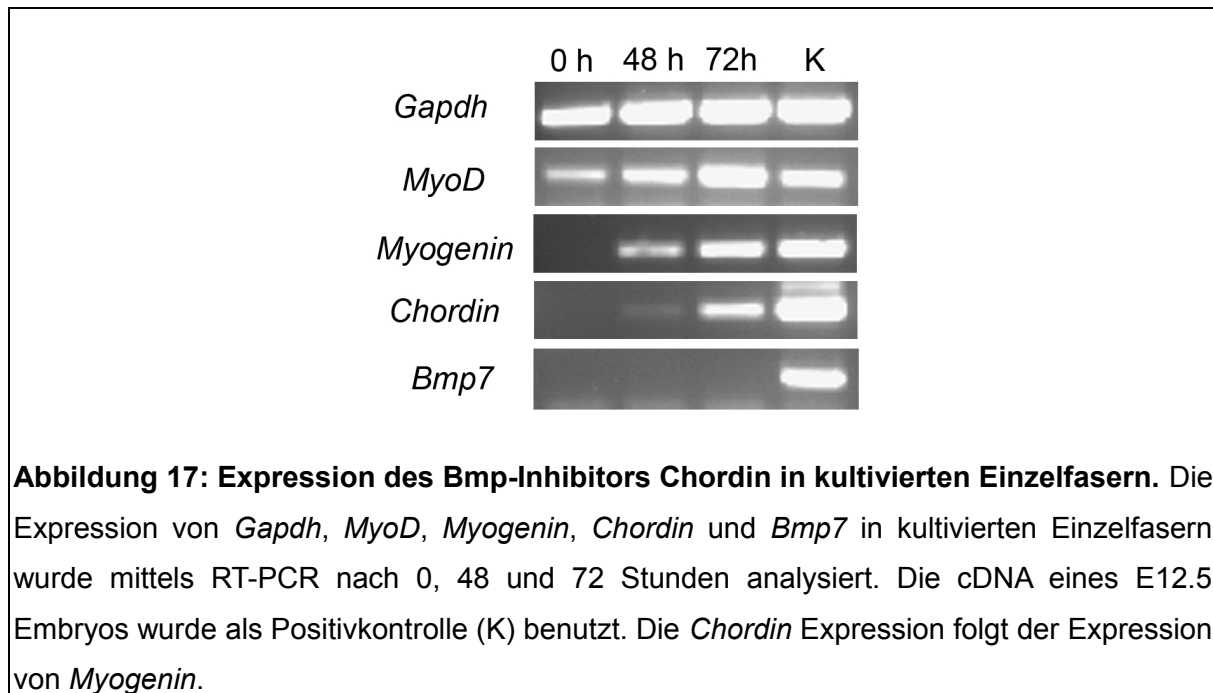
Abbildung 16: Verlust der Reaktivität auf Bmp-Signale während der späten Differenzierung. Die Myoblasten wurden für fünf Tage differenziert und auf die Präsenz von p-Smad (a) untersucht. Die fusionierten Myoblasten zeigen eine abgeschwächte Signalstärke (weißer Pfeil in a) im Vergleich zu proliferierenden Myoblasten (gelber Pfeil in a). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (b). Die weiße Linie zeigt die Kontur der Myotube. 200x Vergrößerung.

p-Smad positive Einzelzellen waren in den Kulturen deutlich erkennbar (gelber Pfeil in Abb. 16a). In fusionierten Myotuben (weißer Pfeil in Abb. 16a, b und c) war die Signalintensität deutlich schwächer und in einigen Kernen fast vollständig reduziert. Zusammen mit der Beobachtung, dass die Kerne der Muskelfaser in Kultur keine deutliche Aktivierung von p-Smad zeigen, lässt sich aus dieser Beobachtung schließen, dass die Fähigkeit auf Bmp-Signale zu reagieren während des Verlaufs der Differenzierung in Muskelfasern verloren geht.

4.2.9 Expression eines Bmp-Inhibitors in kultivierten Satellitenzellen

Die bisher gewonnenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Bmp-Signale die

Proliferation und Differenzierung regulieren. Um festzustellen, ob Satellitenzellen selbst in die Regulation involviert sind, wurden Satellitenzellen auf Muskelfasern für 0, 48 und 72 Stunden kultiviert und die Expression von Bmps und Bmp-Inhibitoren mit semiquantitativer PCR untersucht (Abbildung 17).



Als Kontrolle wurden die Expression von *MyoD* und *Myogenin*, sowie die Expression von *Gapdh* analysiert. Bereits in frisch isolierten Satellitenzellen lassen sich *MyoD* Transkripte schwach nachweisen (D. D. Cornelison and B. J. Wold, 1997), auch wenn zu diesem Zeitpunkt das Protein nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 8b). Es zeigt sich eine Zunahme des Transkripts nach 48 und 72 Stunden in Kultur. Die ersten *Myogenin* Transkripte können nach 48 Stunden in Kultur nachgewiesen werden, wobei auch hier das Protein erst später detektierbar ist (vgl. Abb. 8m). Nach 72 Stunden zeigt sich eine deutlich stärkere Expression von *Myogenin*, die mit dem Auftreten des Myogenin Proteins in diesem Kultursystem korreliert. Unter diesen Bedingungen ließ sich die Expression von *Bmp2*, *Bmp4* und *Bmp7* nicht nachweisen. Interessanterweise ist der Bmp-Inhibitor *Chordin* in diesen Kulturen exprimiert. Schwache *Chordin* Signale sind nach 48 Stunden detektierbar, während die Expression nach 72 Stunden verstärkt auftritt. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass Satellitenzellen, zumindest unter diesen Kulturbedingungen, einen endogenen Bmp-Inhibitor exprimieren, dessen Expression der des

Differenzierungsmarkers *Myogenin* folgt.

4.3 *in vivo* Funktion von Bmp-Signalen während der Muskelregeneration

Da sich in den *ex vivo* Kulturen deutlich zeigte, dass Bmp-Signale die Differenzierung von Myoblasten beeinflussen können, sollte festgestellt werden, ob der Bmp-Signalweg auch während der *in vivo* Muskelregeneration aktiv ist. Dazu wurden regenerierende Muskeln von Mäusen untersucht, die unter standardisierten Bedingungen ein Muskeltrauma erfahren haben (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe "Chirurgische Forschung"). Zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Verletzung wurde zunächst die Histologie der Traumamuskeln analysiert (Abbildung 18). Der unverletzte Kontrollmuskel (Abb. 18a) zeigt eine regelmäßige Muskelfasermorphologie, sowie einige wenige interstitielle Zellen, bei denen es sich höchst wahrscheinlich um Fibroblasten handelt. Einen Tag nach Induktion des Muskeltraumas (Abb. 18b, Tag 1) zeigen sich vermehrt mononukleäre Zellen unterhalb der Muskeleoberfläche, wobei es sich um Leukozyten handelt, deren Invasion charakteristisch für die Regeneration der Muskulatur ist (Literatur). Vier Tage nach Trauma-induktion (Abb. 18c, Tag 4) zeigt sich eine deutlich veränderte Muskelhistologie. Es finden sich zahlreiche Zellen in den regenerierenden Bereichen, wobei sich teilweise keine Muskelfasern mehr erkennen lassen. Nach zehn Tagen der Regeneration (Abb. 18d, Tag 10) lassen sich Bereiche erkennen, die die typischen Kennzeichen regenerierter Muskulatur aufweisen. Lokal treten Muskelfasern mit zentralen Kernen auf und der Durchmesser der einzelnen Muskelfasern ist im Gegensatz zu nicht-regenerierten Muskelfasern deutlich geringer.

Um die einzelnen Stadien der Regeneration näher zu charakterisieren, wurde mittels quantitativer *Realtime* PCR die Expression von *Myogenin* in den Traumamuskeln der unterschiedlichen Stadien untersucht (Abb. 18e). Dabei zeigte sich einen Tag nach Induktion des Traumas eine geringere Expression von *Myogenin* im Vergleich zur Kontrolle. Nach vier Tagen Regeneration war die Expression deutlich erhöht. Es erfolgte anschließend eine Abnahme der *Myogenin*-Expression im Vergleich zu Tag 4. Im Vergleich zur unverletzten Muskulatur war diese jedoch weiterhin leicht erhöht.

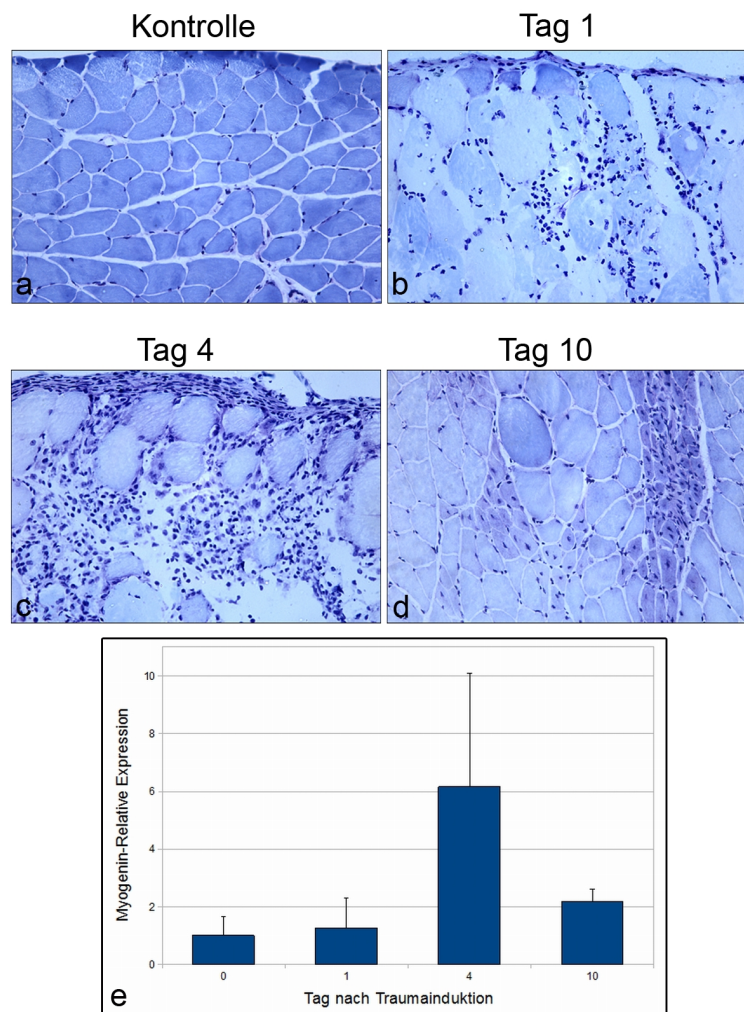


Abbildung 18: Analyse des Regenerationsprozesses nach Muskeltrauma. Histologische Schnitte des *M. gastrocnemius* vor (a) und nach Induktion des Traumas (b-d) wurden mit Tolloidin Blau gefärbt. An Tag 1 nach Trauma-induktion (b) zeigt sich die Invasion mononukleärer Zellen. An Tag 4 (c) zeigt sich lokal starke Regeneration, während an Tag 10 (d) der Regenerationsprozess nahezu abgeschlossen ist und regenerierte Muskelfasern deutlich erkennbar sind. 200x Vergrößerung. (e) Die Analyse der *Myogenin*-Expression zeigt die stärkste Regeneration vier Tage nach Trauma-induktion (n=6 Kontrollen, n=2 an Tag 1 und n=3 an Tag 4 und Tag 10).

Um eine Beteiligung des Bmp-Signalwegs während der Muskelregeneration zu untersuchen, wurden histologische Schnitte der regenerierenden Muskeln mittels Immunfluoreszenz gegen Laminin- $\alpha 2$, einem Hauptbestandteil der Basallamina, die jede Muskelfaser und die daran befindlichen Satellitenzellen umschließt, und MyoD analysiert. Auf Parallelschnitten wurde mittels Immunfluoreszenz Laminin- $\alpha 2$ (Lama 2) zusammen mit der Expression von p-Smad analysiert.

In unverletzten Muskeln (Abbildung 19), sowie an Tag 1 nach Traumainduktion waren keine MyoD-positiven Zellen (Abb. 19b) unterhalb der Lama2-positiven Basallamina erkennbar (Abb. 19a und e). Ebenso waren keine p-Smad-positiven Zellen zu finden (Abb. 19f).

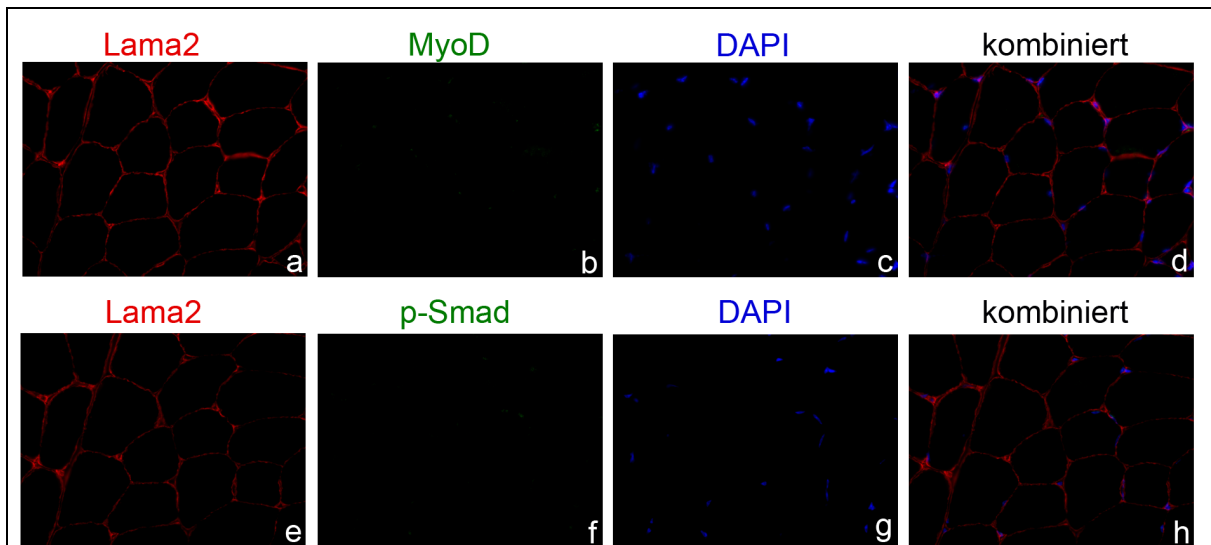


Abbildung 19: MyoD und p-Smad sind in unverletzter Muskulatur nicht detektierbar. Parallelschnitte eines unverletzten Muskels wurden mittels Immunfluoreszenz gegen Lama2 (a, e) und MyoD (b) oder p-Smad (f) analysiert. Lama2 ist in der Basallamina detektierbar, während die Transkriptionsfaktoren MyoD und p-Smad nicht nachgewiesen werden können. Die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt (c, g). Die Kombination aller Kanäle ist d und h dargestellt. 400x Vergrößerung.

An Tag 4 nach Traumainduktion (Abbildung 20), befinden sich unterhalb der Basallamina stark regenerierender Muskelfasern, welche durch die gesteigerte Expression von Lama2 gekennzeichnet sind (Abb. 20a und e), zahlreiche MyoD-positive Zellen (Abb. 20b). Dies zeigt deutlich, dass die Muskulatur aktiv regeneriert und die Satellitenzellen während dieses Prozesses zahlreiche MyoD-positive Myoblasten hervorgebracht haben. Es zeigte sich deutlich, dass p-Smad-positive Zellen in regenerierenden Muskelfasern vorhanden sind (Abb. 20f), was eindeutig zeigt, dass Bmp-Signale während der Regeneration die Satellitenzellen stimulieren. Innerhalb der regenerierenden Muskelfasern finden sich außerdem sowohl MyoD-negative als auch p-Smad-negative Kerne, woraus sich schließen lässt, dass auch *in vivo* die Zellkerne der regenerierenden Faser nicht durch Bmps stimuliert wurden.

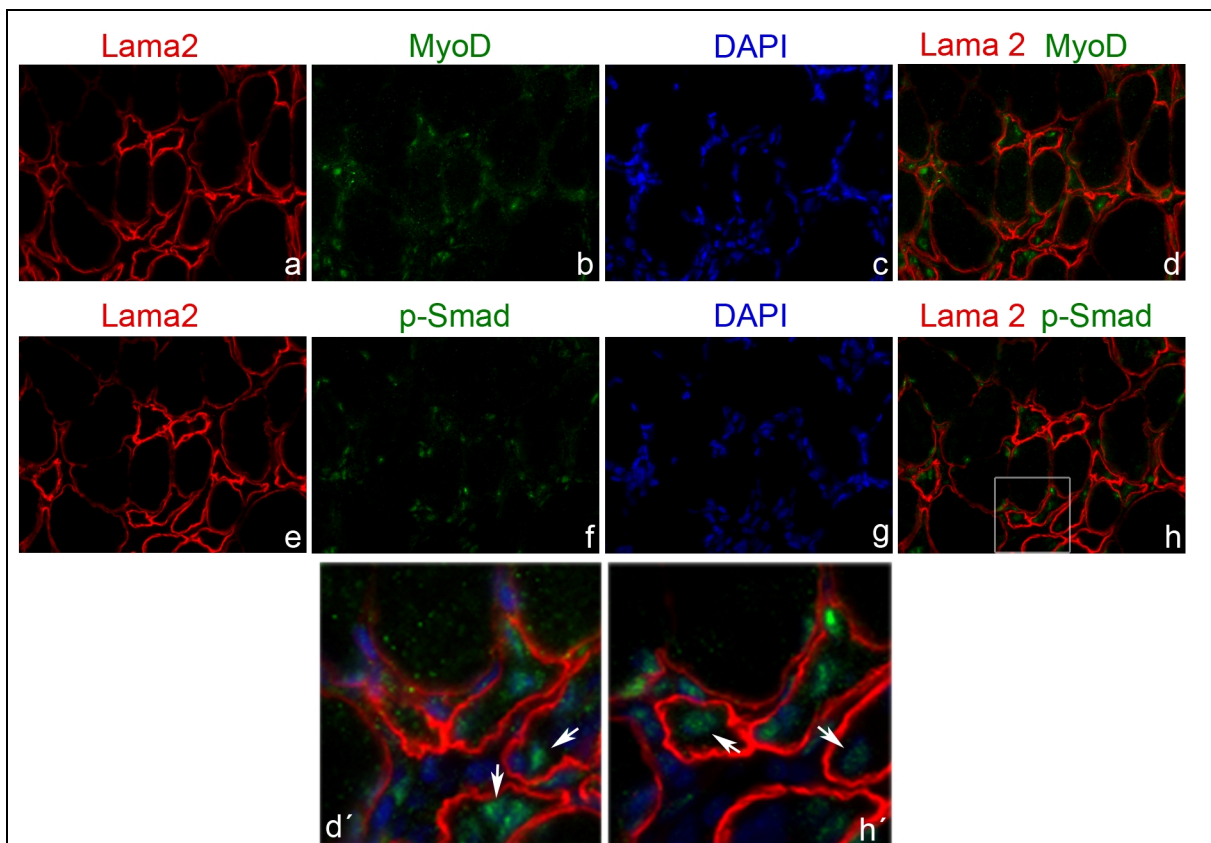


Abbildung 20: Aktive Bmp-Signale während der Muskelregeneration. Parallelschnitte eines regenerierenden *M. gastrocnemius* wurden mittels Immunfluoreszenz auf die Expression von Lama2 (a, e), MyoD (b) und p-Smad (f) untersucht. Die Myonuklei wurden mit DAPI gegengefärbt (c, g). Vier Tage nach Trauma lassen sich sowohl MyoD- als auch p-Smad-positive Myonuklei lassen sich unterhalb der Lama2-positiven Basallamina detektieren (weißer Pfeil in d' und h'). 400x Vergrößerung.

Zehn Tage nach Traumainduktion (Abbildung 21) ist die Expression von MyoD in den regenerierten Muskelfasern, die an zentral positionierten Myonuklei erkannt werden können (Abb. 21b und Pfeil in Abb. 21d'), noch vorhanden, wenn auch in einem wesentlich geringeren Maße als an Tag 4 nach Traumainduktion. Es finden sich jedoch nur noch einzelne schwach p-Smad-positive Kerne (Abb. 21f und Pfeilspitze in h') unterhalb der Basalmembran regenerierter Muskelfasern (Abb. 21e), was nahelegt, dass Bmp-Signale zum Ende der Regeneration deutlich abgeschwächt sind.

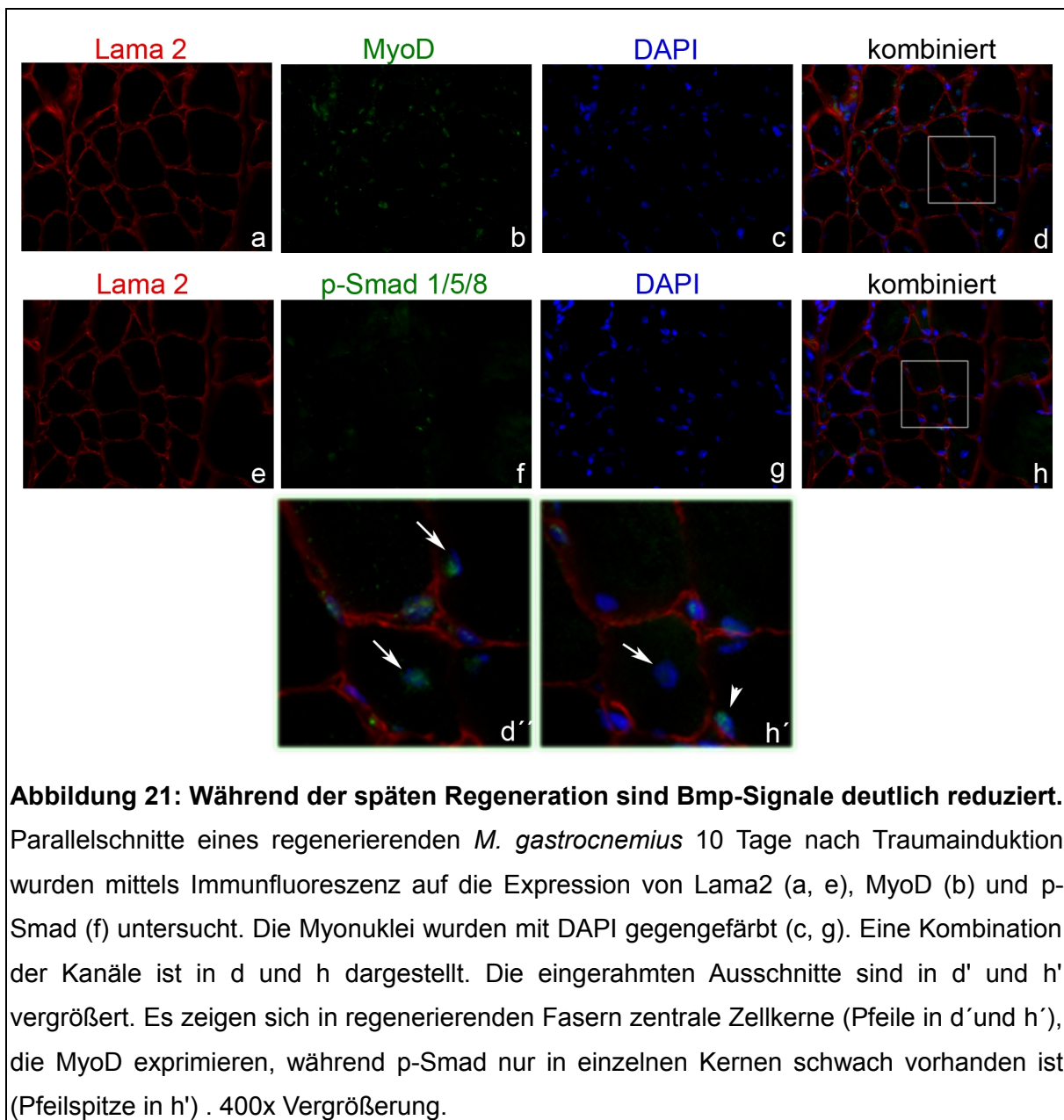


Abbildung 21: Während der späten Regeneration sind Bmp-Signale deutlich reduziert. Parallelschnitte eines regenerierenden *M. gastrocnemius* 10 Tage nach Traumainduktion wurden mittels Immunfluoreszenz auf die Expression von Lama2 (a, e), MyoD (b) und p-Smad (f) untersucht. Die Myonuklei wurden mit DAPI gegengefärbt (c, g). Eine Kombination der Kanäle ist in d und h dargestellt. Die eingerahmten Ausschnitte sind in d' und h' vergrößert. Es zeigen sich in regenerierenden Fasern zentrale Zellkerne (Pfeile in d' und h'), die MyoD exprimieren, während p-Smad nur in einzelnen Kernen schwach vorhanden ist (Pfeilspitze in h'). 400x Vergrößerung.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ebenso wie in den kultivierten Myoblasten, die Bmp-Signale während der Regeneration reguliert werden und in fusionierten Myonuklei verloren gehen.

Um herauszufinden ob auch die *in vivo* Regeneration und Differenzierung mit der Expression eines Bmp-Inhibitors einhergeht, wurde die Expression von *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Noggin* und *Chordin* mittels quantitativer PCR analysiert (Abbildung 22). Obwohl die Expression aller getesteter Komponenten im regenerierenden Muskel

nachweisbar waren, ließ sich eine Regulation im Verlauf der Regeneration nur für den Bmp-Inhibitor *Chordin* nachweisen. Interessanterweise zeigte sich einen Tag nach Induktion des Traumas eine Schwächung der Expression. Nach vier Tagen zeigte die Expression ein ähnliches Niveau wie in den Kontrollen. Eine deutliche Zunahme von *Chordin*-Transkripten war zum Ende der Regeneration (Tag 10) detektierbar.

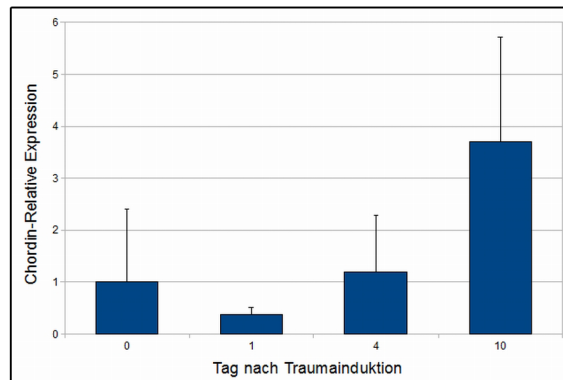


Abbildung 22: Die Expression des Bmp-Inhibitors *Chordin* ist während der Regeneration reguliert. Analyse der *Chordin*-Expression im Verlauf der Muskelregeneration mittels qPCR. Einen Tag nach Trauma-induktion ist die Expression verringert und steigt an Tag4 auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle. Zum Ende der Regeneration nach 10 Tagen zeigt sich eine Heraufregulation der *Chordin*-Expression (n=6 Kontrollen, n=2 an Tag 1 und n=3 an Tag 4 und Tag 10).

Aus den *in vivo* Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Bmp-Signalweg während der frühen Muskelregeneration aktiv ist und mit Fortschreiten des Prozesses inaktiviert wird. In Einklang damit lässt sich die Expression eines endogenen Bmp-Inhibitors zum Ende der Regeneration feststellen.

5. Diskussion

Die Skelettmuskulatur ist ein lebenswichtiges Organ, deren Regenerationsfähigkeit die Funktion bis ins hohe Alter gewährleistet. Diese Regenerationsfähigkeit ist auf das Vorhandensein von Muskelstammzellen, den so genannten Satellitenzellen, zurückzuführen. Satellitenzellen reagieren während der Regeneration auf eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die ihr Schicksal beeinflussen. Obwohl bekannt ist, dass die koordinierte Expression von Bmps und deren Antagonisten eine essentielle Rolle bei der Myogenese spielt, ist eine Beteiligung dieser Wachstumsfaktoren an der Regulation von Satellitenzellen bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde die Funktion des Bmp-Signalwegs während der Differenzierung von Satellitenzellen untersucht. Die detaillierte Analyse zeigte, dass aktivierte Satellitenzellen auf Bmp-Signale reagieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass Bmp-Signale die Expression von des Transkriptionsfaktors Pax7 unterstützen. Des Weiteren zeigte sich, dass Bmp-Signale die Proliferationsrate erhöhen und dadurch den Austritt der Satellitenzellen aus dem Zellzyklus verhindern. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der Bmp-Signale zum Austritt aus dem Zellzyklus und somit zu einer Reduzierung der Zellzahl und zur gesteigerten Bildung von Myotuben. Interessanterweise wurde die Expression des Bmp-Inhibitors *Chordin* während des Differenzierungsprozesses beobachtet. Wie in den *ex vivo* Analysen zeigten sich aktivierte Bmp-Signale in der regenerierenden Muskulatur während der frühen Differenzierung. Zu einem späteren Zeitpunkt während der Differenzierung, wenn die Expression von Myogenin nachlässt, konnte eine gesteigerte Expression des Bmp-Inhibitors Chordin und die Herunterregulation der Bmp-Signale festgestellt werden.

5.1 Bmp-Signale sind mit der myogenen Differenzierung vereinbar

Bei der Untersuchung der Wirkung von Bmps auf Satellitenzellen konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu C2C12 Zellen, primäre Myoblasten durch den Einfluss von Bmps nicht in Osteoblasten transdifferenzieren. Die Wirkung von Bmp-Signalen auf die Muskulatur wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. So führt die

Injektion von BMPs in den Muskel dazu, dass dieser durch Knochen ersetzt wird, wodurch die BMPs ihren heutigen Namen erhielten (Urist und Strates, 1971; Urist, 1965). Die ektopische Bildung von Knochen wurde auch bei dem humanen Syndrom FOP (Fibrodysplasia ossificans progressiva), sowie bei ektopischer Expression von Bmp4 unter dem NSE Promotor in transgenen Mäusen, beobachtet (Kan et al., 2004; Kaplan et al., 2008). Da die Knochenbildung bei der FOP verstärkt nach Verletzung des Muskels auftritt, galten Satellitenzellen als mögliche Quelle der ektopischen Knochenbildung (Lounev et al., 2009). Mittlerweile ist bekannt, dass eine konstitutiv aktivierenden Mutation im Bmp-Rezeptor *Acvr1* das humane Syndrom FOP verursacht (Shore et al., 2006). In jüngster Zeit konnten allerdings eine Transdifferenzierung von Satellitenzellen als Ursache für die Knochenbildung ausgeschlossen werden. Stattdessen scheint eine Population von *Tie2* exprimierenden Endothelzellvorläufern maßgeblich an der Knochenbildung beteiligt zu sein (Lounev et al., 2009).

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie C2C12 Zellen zeigt das Potential in Muskelfasern zu differenzieren, lässt sich jedoch unter der Wirkung von Bmps in Osteoblasten differenzieren. Obwohl diese Zellen ursprünglich aus dem regenerierenden Muskel einer Maus isoliert wurden, zeigen sie sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch morphologisch erhebliche Unterschiede zu primären Myoblasten (Cornelison, 2008). Es wird daher angenommen, dass die Transdifferenzierung von C2C12 Zellen in Osteoblasten eine einzigartige Fähigkeit dieser Zellen ist und nicht ohne weiteres auf primäre Myoblasten übertragen werden kann. In Einklang damit konnte in dieser Arbeit der Erhalt der muskelspezifischen Genexpression nach Bmp-Behandlung festgestellt werden, während keine Hinweise auf eine osteoblastenspezifische Genexpression gefunden werden konnten.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass einige wenige Studien auch die Transdifferenzierung von Satellitenzellen und Myoblasten in Osteoblasten nach Bmp-Behandlung beschrieben haben (Wada et al., 2002; Komaki et al., 2004). Es ist möglich, dass eingesetzte Konzentrationen von Bmps, ebenso wie die klonale Expansion von Myoblasten diese Effekte hervorrufen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen aber darauf hin, dass Bmp-Signale die terminale Differenzierung von Myoblasten regulieren ohne das Zellschicksal zu ändern, da der Bmp-Signalweg in der Muskulatur während der Regeneration aktiv ist.

5.2 Bmps regulieren die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten

5.2.1 Bmps regulieren die Expression von Pax7

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation von Satellitenzellen mit Bmps die Expression von Pax7 unter Kulturbedingungen aufrecht erhalten werden kann. Kultivierte Satellitenzellen, in denen Pax7 viral überexprimiert wurde, zeigen eine verzögerte Differenzierung, wie sie auch in dieser Arbeit durch die Stimulation des Bmp-Signalwegs festgestellt werden konnte (Zammit et al., 2006). Es ist daher möglich, dass Bmp-Signale die Differenzierung durch eine gesteigerte Pax7 Expression verzögern. Andererseits führt die konditionale Deletion von *Pax7* in adulten Satellitenzellen zu keiner offenkundigen Störung der Muskelregeneration *in vivo* (Lepper et al., 2009). Eine Notwendigkeit für den Transkriptionsfaktor Pax7 besteht demnach, zumindest in Mäusen, nur bis zur frühen Adoleszenz, wenn die Satellitenzellen mitotisch ruhend werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Bmps während der Muskelregeneration nicht ausschließlich über einen Pax7-abhängigen Mechanismus wirken.

5.2.2 Bmp-Signale induzieren die Zellzyklus-Progression und inhibieren die terminale Differenzierung von Myoblasten

Die Untersuchungen der Myoblastenkulturen zeigten einen deutlichen Einfluss der Bmp-Signale auf die Proliferation und Differenzierung. Bmp-Signale stimulierten dabei die Proliferation, während die Inhibition der Bmp-Signale die terminale Differenzierung in Myotuben deutlich stimulierte. Für unterschiedliche Vorläuferzellen wie z.B. Pankreasvorläuferzellen wurde beschrieben, dass Bmps die Proliferation aktivieren können (Hua et al., 2006). Bmps wirken auf Zellen indem sie die Phosphorylierung der Smad-Proteine durch Bindung an Ihre Rezeptoren induzieren. Diese wiederum können dann Bmp-Zielgene aktivieren indem sie als Transkriptionsfaktoren die Genexpression stimulieren. Mittlerweile gelten die "inhibitors of differentiation", *Id1-Id3* als eindeutige Zielgene der Bmps und Bindestellen für Smad-Transkriptionsfaktoren konnten in den Promotoren der *Id*-Gene identifiziert werden (Ying et al., 2003; Lopez-Rovira et al., 2002). So wurde u.a. beschrieben, dass Bmp-Signale durch einen Id-abhängigen Mechanismus in

embryonalen Stammzellen die Differenzierung verhindern (Hollnagel et al., 1999). Id-Proteine sind bemerkenswert vielfältig und beeinflussen auf unterschiedliche Weise das Zellschicksal.

Es ist wahrscheinlich, dass der Effekt der Bmp-Signale auf die Proliferation und Differenzierung der Myoblasten auf diese Proteine zurückgeführt werden kann. Für Id1, Id2 und Id3 konnte gezeigt werden, dass deren Expression direkt durch Bmp-Signale stimuliert wird (Ying et al., 2003; Lopez-Rovira et al., 2002). Außerdem wurde für mehrere Id-Proteine gezeigt, dass diese direkt in die Zellzyklusmaschinerie eingreifen können und so eine Progression durch den Zellzyklus bewirken und die Differenzierung inhibieren (Zebedee und Hara, 2001). So bindet z.B. Id2 an pRB (retinoblastoma protein), und verhindert die Bildung eines inhibitorischen Komplexes mit E2F Transkriptionsfaktoren. Die E2F Transkriptionsfaktoren können dann die Transkription von Genen, die für den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus benötigt werden, aktivieren (Leone et al., 1998). Des Weiteren konnte für Id1 gezeigt werden, dass dieses Protein mit den ubiquitär exprimierten E-Proteinen, bHLH Transkriptionsfaktoren, die von dem E2A Gen kodiert werden, interagiert. Dadurch wird die Expression von p21CIP herunterreguliert. p21CIP ist ein Inhibitor von G1 Cdk's (cyclin dependent kinase), die den inhibitorischen Komplex aus pRB und E2F destabilisieren, indem sie pRB hyperphosphorylieren. Eine Herunterregulation von p21CIP führt in diesem Falle zur Aktivierung von Cdk's und in der Konsequenz ebenfalls zur Dissoziation des pRB/E2F Komplex.

Jüngst konnte gezeigt werden, dass die Muskelregeneration in *Id1/Id3* defizienten Mäusen erheblich gestört ist (Clever et al., 2010). Übereinstimmend mit der in dieser Arbeit festgestellten erhöhten Proliferationsrate durch Stimulation des Bmp-Signalwegs, konnte in den *Id*-defizienten murinen Muskeln eine Reduktion der Anzahl Pax7-exprimierender, proliferierender Satellitenzellen festgestellt werden (Clever et al., 2010). Dies legt nahe, dass die Aktivierung der Expression der Id-Proteine der Bmp-abhängigen Muskelregeneration zu Grunde liegt.

Andere Studien weisen darauf hin, dass Pax7 die Expression von *Id3* in Satellitenzellen direkt reguliert (Kumar et al., 2009). Dies könnte bedeuten, dass Bmps und Pax7 ein gemeinsames Zielgen besitzen und zumindest während der Proliferation (in ruhenden Satellitenzellen kann kein p-Smad festgestellt werden) dieses gemeinsam regulieren. Da aber auch Bmp-Signale die Expression von Pax7 stimulieren können (vgl. 4.2.3) und Bmp4 und Bmp6 in Pax7 exprimierenden C2C12

Zellen hochreguliert sind (Kumar et al., 2009; Fukada et al., 2007), wird es interessant sein die Wechselwirkungen zwischen diesen Faktoren näher zu untersuchen.

5.2.3 Bmp-Signale inhibieren die Expression und Aktivität von MRFs

Id-Proteine greifen nicht nur aktiv in die Zellzyklusmaschinerie ein, sondern inhibieren auch direkt die Differenzierung über einen anderen Wirkmechanismus. Sie inaktivieren bHLH Transkriptionsfaktoren, zu denen die Mitglieder der MRFs MyoD und Myogenin gehören. Ihre transkriptionelle Aktivität setzt die Dimerisierung mit E-Proteinen voraus. So führt die Bindung von Id-Proteinen dazu, dass die bHLH Transkriptionsfaktoren nicht mehr an DNA binden können und so Ihre Zielgene nicht stimulieren können (Kreider et al., 1992). Dieser Mechanismus trägt sicherlich zur Verzögerung der Differenzierung nach Bmp-Behandlung bei, da die transkriptionelle Aktivität von MyoD und auch Myogenin inhibiert wird (Benezra et al., 1990).

5.2.4 Sekundäreffekte beeinflussen das Verhalten primärer Myoblasten in Kultur

Die Analyse des Differenzierungsprozesses in primären Myoblasten legt, ebenso wie die Analyse der C2C12 Zellen nahe, dass Bmp-Signale die Myoblasten in einem proliferierenden Zustand halten, während die Inhibition von Bmps zum Austritt aus dem Zellzyklus und zur terminalen Differenzierung führt. So zeigte sich nach Bmp-Behandlung eine erhöhte Zellzahl, während die Noggin-Behandlung diese signifikant reduzierte. Ebenso war die Anzahl terminal differenzierter Zellen nach Bmp-Inhibition erhöht und nach Stimulation mit Bmps reduziert. Die Analyse der BrdU Inkorporation zeigte aber, wider Erwarten, eine niedrigere Rate der BrdU Inkorporation nach drei Tagen Differenzierung unter dem Einfluss von Bmps im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine mögliche Ursache könnte die hohe Zelldichte in den Bmp-behandelten Kulturen sein und die dadurch verursachte Kontaktinhibition, die im weiteren Verlauf zwangsweise zur Differenzierung der Zellen führen würde (Partridge, 1997).

5.2.5 Die terminale Differenzierung von Myoblasten wird in Abwesenheit von Bmp-Signalen beschleunigt

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich, dass die Inhibition von Bmp-Signalen die Differenzierung in Myotuben auf Kosten der Proliferation stimulierte. In den Bmp-behandelten Kulturen ließ sich deutlich feststellen, dass die Anzahl der Zellen, die festgelegt sind, den Zellzyklus zu verlassen (mononukleär, Myogenin-positiv) und die der bereits differenzierten Zellen (fusioniert), signifikant reduziert waren. Interessanterweise war die Anzahl der mononukleären, Myogenin-positiven Zellen in den Noggin behandelten Myoblastenkulturen ebenfalls reduziert. Es zeigte sich außerdem eine deutliche Zunahme der terminal differenzierten Myoblasten. Aufgrund der Tatsache, dass nicht alle Zellen in Kultur gleich sensitiv auf Bmp-Signale und deren Inhibition reagieren, könnte möglicherweise die Behandlung der Zellen mit Noggin die Expression von Myogenin in der Initialphase der Differenzierung stimulieren, und so die Differenzierung aktivieren, während nach drei Tagen die verbleibende proliferative Population einer Inhibition von Bmp-Signalen gegenüber weitestgehend resistent ist. Andererseits ist es auch möglich, dass die Differenzierung, die durch die Inhibition der Bmp-Signale verstärkt wird, unabhängig von der Expression von Myogenin stattfindet. Obwohl die Deletion von Myogenin in Mäusen letal ist, scheint auch dieser Transkriptionsfaktor für die Regeneration des adulten Muskels entbehrlich zu sein (Meadows et al., 2008b). So zeigt sich nach postnataler Deletion von Myogenin eine normal verlaufende Muskelregeneration ebenso wie eine unveränderte Differenzierung primärer Myoblasten. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Expression von Myogenin bereits vor dem Austritt aus dem Zellzyklus auftritt und unabhängig von der Expression von Zellzyklusregulatoren reguliert wird (Yoshida et al., 1998). Unter der Annahme, dass die Bmp-Signale einen direkten Eingriff in den Zellzyklus bewirken, könnte die Möglichkeit bestehen, dass der durch Bmp-Inhibition verursachte Austritt der Myoblasten aus dem Zellzyklus unabhängig von der Myogenin-Expression auftritt.

5.3 Expression der Bmp-Signalweg-Komponenten

Die Analyse der Muskelregeneration *in vivo* zeigte, dass der Bmp-Signalweg in

Satellitenzellen während der Regeneration aktiviert wird. Es konnte jedoch keine Stimulation der untersuchten Bmps während der Regeneration festgestellt werden. Überraschenderweise konnten neueste Studien zeigen, dass ruhende Satellitenzellen, aber nicht aktivierte Satellitenzellen, selbst Bmps exprimieren (Fukada et al., 2007; Kumar et al., 2009). Für die Mediatoren des Bmp-Signalwegs (p-Smad) hingegen, konnte in dieser Arbeit eine gegenteilige Verteilung gezeigt werden. Es lässt sich daher nahezu ausschließen, dass es sich bei der Aktivierung des Bmp-Signalwegs in Satellitenzellen um einen direkten, autoregulatorischen Mechanismus handelt. Auch wurde die Expression des Bmp-Inhibitors *Chordin-like 2* spezifisch in ruhenden Satellitenzellen festgestellt (Fukada et al., 2007). Dies lässt aufgrund der Tatsache, dass in ruhende Zellen kein p-Smad detektiert werden kann, den Schluss zu, dass Bmp-Signale nicht an der Aufrechterhaltung des Ruhezustandes der Satellitenzelle beteiligt sind.

Auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Traumamodell zeigte sich keine Stimulation der Expression der untersuchten Bmps im Verlauf der Regeneration. Ein möglicher Mechanismus, der den Bmp-Signalweg unabhängig von der Transkription regulieren könnte, ist für Hgf beschrieben. Diese Proteine, die die Satellitenzellen *in vivo* aus dem Ruhezustand aktivieren, werden in der extrazellulären Matrix gespeichert. Sofort nach einer Verletzung kommt es zur Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus der extrazellulären Matrix, wodurch diese auf die Satellitenzellen wirken und diese in einen aktivierten Zustand überführen (Tatsumi et al., 2002).

Neben dieser Möglichkeit könnten andere Faktoren die Reaktionsfähigkeit der ruhenden Satellitenzellen auf Bmp-Signale beeinflussen. So gibt es sogenannte inhibitorische Smad Proteine, die trotz der Bindung von Bmps an ihre Rezeptoren, die Weiterleitung der Bmp-Signales unterbinden. Dabei konkurriert Smad7 mit den R-Smads um die Bindung an den Rezeptor (Nakao et al., 1997). Des Weiteren wurde die Bindung von Smurf1 und Smurf2 an inhibitorische Smads gezeigt, wodurch es letztendlich zu einer Ubiquitinylierung des aktivierten Bmp-Rezeptors und zu dessen Degradierung kommt (Ebisawa et al., 2001; Murakami et al., 2003; Kavsak et al., 2000).

Es sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass eine Expressionsanalyse in *mdx*-Mäusen, dem murinen Modell der Duchenne Muskeldystrophie, die Heraufregulation von Bmp15 im regenerierenden Muskel zeigte (Turk et al., 2005). Die Expression von Bmp15 wurde bisher nur im Ovar beschrieben und ist essentiell für dessen korrekte Entwicklung und Funktion (Dube et al., 1998; Di Pasquale et al., 2004). Ob diese Expression aber spezifisch für die Regeneration des Muskels oder aber spezifisch für die Regeneration des dystrophischen Muskels ist, bleibt unklar.

Heterozygote Mutationen in Bmps, ihren Rezeptoren und Smads verursachen unterschiedliche humane Syndrome, wie z.B pulmonare Hypertonie (Bmpr2), juvenile Polyposis (Bmpr1a) sowie Entwicklungsstörungen der Augen, des Gehirns und des Skeletts (Bmp4) (Bakrania et al., 2008; Lane et al., 2000; Zhou et al., 2001). Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass diese mit Muskelerkrankungen einhergehen. Das kann zum einen daran liegen kann, dass die heterozygote Expression im Muskel ausreichend ist um die Muskelregeneration zu gewährleisten. Zum anderen könnte aber auch während der Regeneration *in vivo* der Verlust eines einzelnen Faktors durch die Vielzahl anderer Faktoren, die an der Muskelregeneration beteiligt sind, wie HGFs oder Fgfs, kompensiert werden (Sheehan und Allen, 1999). Die redundante Wirkung anderer Bmps könnte ebenfalls den Verlust eines einzelnen Bmp-Allels kompensieren.

Interessanterweise konnte die Expression eines endogenen Bmp-Inhibitors in *ex vivo* kultivierten Muskelfasern und in regenerierenden Muskeln festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass während der Differenzierung die Bmp-Signale aktiv inhibiert werden. Die Kinetik dieser Inhibition ist aber in den *ex vivo* Kulturen und im adulten, regenerierenden Muskel deutlich unterschiedlich. So wird *Chordin* in den *ex vivo* Kulturen zeitgleich mit *Myogenin* reguliert, während die *Chordin*-Expression *in vivo* erst während der späten Differenzierung, wenn die Expression von *Myogenin* bereits wieder abgenommen hat, exprimiert wird. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern eine Vielzahl von Studien, die zeigen, dass Satellitenzellen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen im Muskel während der Regeneration interagieren (Christov et al., 2007; Ten Broek et al., 2010). So befinden sich in der Muskulatur neben Muskelfasern und Satellitenzellen andere Zelltypen, die die Regeneration beeinflussen. So sind Immunzellen, Endothelzellen und Zellen der sogenannten Seitenpopulationen während der *in vivo* Regeneration vorhanden, die in den

Regenerationsprozess eingreifen. Das Fehlen dieser unterschiedlichen Zelltypen in den *ex vivo* Kulturen könnte so die Kinetik der Regeneration deutlich verändern.

5.4 Klinische Relevanz

Die Muskelregeneration spielt nicht nur eine wichtige Rolle nach einer Verletzung, sondern auch in einer Vielzahl humaner Syndrome, wie z.B. Duchenne Muskeldystrophie (DMD). Diese Erkrankung wird durch Mutationen im Dystrophin-Gen verursacht. Dieses Strukturprotein, welches in den sogenannten Dystrophin-Glycoprotein-Komplex eingebunden ist, verbindet das Zytoskelett der Muskelfaser mit der extrazellulären Matrix, und gewährleistet die Kraftübertragung (Cossu and Mavilio, 2000). Im Gegensatz zur Regeneration nach einer Verletzung, bei der die Funktion des Muskels wieder hergestellt wird, ist die Regeneration der erkrankten Muskulatur ineffizient, da die Satellitenzellen zwar Myoblasten hervorbringen, diese aber ebenfalls *Dystrophin*-defizient sind. Eine mögliche Therapieform ist die *ex vivo* Kultivierung von Satellitenzellen, die verkürzte, aber funktionale Varianten von Dystrophin nach viralem Gen-Transfer exprimieren und eine anschließende Retransplantation in die Muskulatur. Ein Problem dabei ist die Isolierung von Satellitenzellen und Myoblasten in ausreichenden Mengen aus der erkrankten Muskulatur, besonders in fortgeschrittenen Stadien der Krankheit, da durch permanente Aktivität der Satellitenzellen dieser Pool nach und nach erschöpft. Die Veränderung der Kinetik der Myoblastendifferenzierung in den verbleibenden Zellen stellt ein weiteres Problem dar, da die Satellitenzellen in chronisch regenerierenden Muskeln schneller zu altern scheinen, so dass es nach und nach zu deren Dysfunktion und zu einer verfrühten Differenzierung kommt (Cossu and Mavilio, 2000). Möglicherweise könnten die hier gewonnenen Ergebnisse dazu beitragen, Satellitenzellen in ausreichender Menge *ex vivo* zu kultivieren und deren verfrühte Differenzierung durch die Behandlung zu unterbinden. Somit könnten Myoblasten in ausreichender Menge für eine effiziente Retransplantation in den dystrophen Muskel kultiviert werden.

5.5 Schlussfolgerung und Modell zur Rolle der Bmps während der Regeneration

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren sind an der Regulation der Regeneration des Muskels beteiligt. Bmps scheinen daher während der Muskelregeneration in ein Netzwerk aus Signalen integriert zu sein. Es wird interessant sein das regulatorische Netzwerk des Bmp-Signalwegs in Satellitenzellen weiter zu entschlüsseln und die Interaktion mit anderen Signalwegen zu untersuchen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit konnten zwar zeigen, dass Bmp-Signale die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten regulieren, eine vollständige Unterdrückung der Differenzierung durch Behandlung mit Bmps war aber nicht möglich. Möglicherweise regulieren mehrere Signalwege parallel zueinander das Verhältnis von Proliferation und Differenzierung, wobei Fgf und TGF β nur zwei mögliche interagierende Signalwege sind. Da Fgfs ebenfalls positiv die Proliferation stimulieren, während sie die Differenzierung inhibieren, könnten Fgfs und Bmps synergistisch die Aktivität der Satellitenzellen regulieren. Tgf β s hingegen könnten antagonistisch wirken, da sie die Proliferation inhibieren. Des Weiteren wird es interessant sein herauszufinden, wie die Bmp-Signale selektiv auf Satellitenzellen, nicht aber auf andere Populationen, wie z.B. die an der Entstehung der FOP beteiligten *Tie2*-positiven Endothelvorläufer, wirken.

Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lässt sich das folgende Modell zur Rolle des Bmp-Signalwegs in Satellitenzellen während der Muskelregeneration ableiten:

Die Satellitenzellen werden nach einer Verletzung unabhängig von Bmp-Signalen oder in Synergie mit anderen Faktoren wie Hgf aktiviert. Nach der Aktivierung reagieren Satellitenzellen auf Bmp-Signale mit einer Aufrechterhaltung der Pax7 Expression und einer gesteigerten Proliferation. Dieser Effekt basiert höchstwahrscheinlich auf der Aktivität der Id-Proteine. Nachdem das Schicksal der Zellen zu Differenzierung festgelegt wurde, sorgt die intrinsische Expression eines Bmp-Inhibitors für eine Inhibition der Bmp-Signale und ermöglicht so den Austritt der Myoblasten aus dem Zellzyklus und die Differenzierung in Myotuben. Im weiteren Verlauf der terminalen Differenzierung verlieren dann die fusionierten Myoblasten das Potential auf Bmp-Signale zu reagieren.

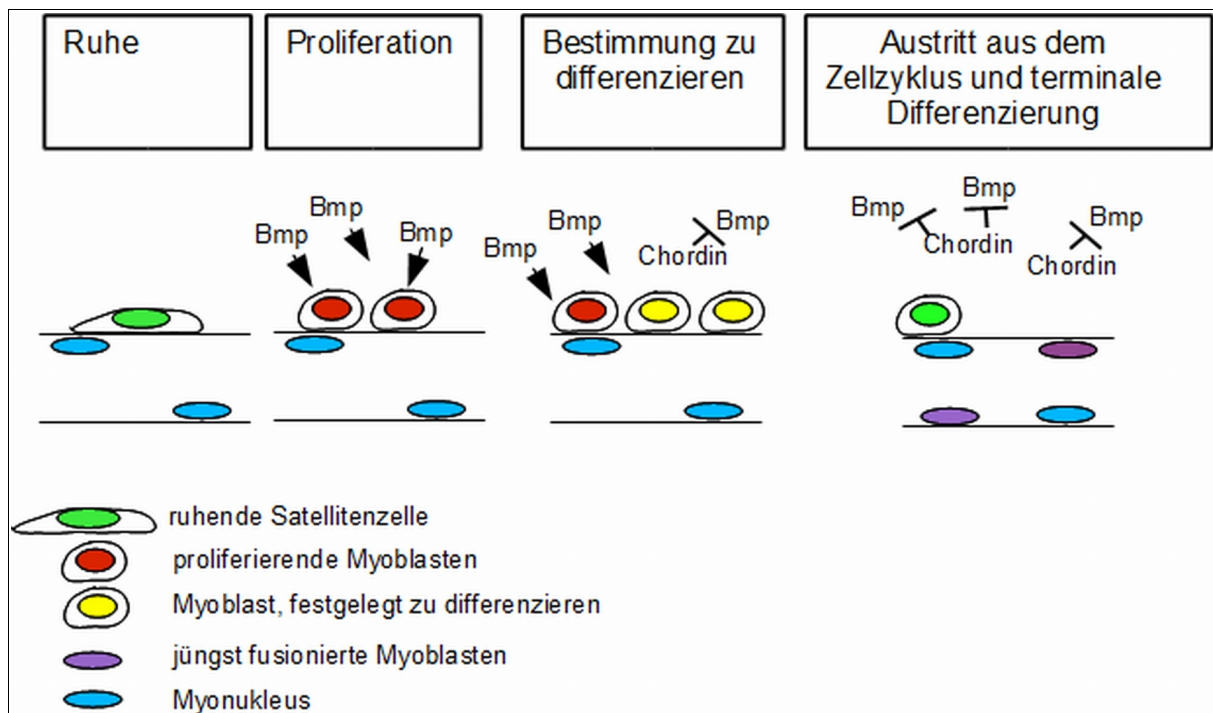


Abbildung 23: Model zur Funktion des Bmp-Signalwegs während der Muskelregeneration. Die Satellitenzellen werden Bmp-unabhängig aktiviert. Während der Proliferation wirken Bmps auf die Satellitenzellen/Myoblasten und verhindern den Austritt aus dem Zellzyklus. Nachdem die Myoblasten darauf festgelegt wurden zu differenzieren, bewirkt die endogene Expression eines Bmp-Inhibitors den Austritt aus dem Zellzyklus und die terminale Differenzierung.

6. Zusammenfassung

Die Fähigkeit der Skelettmuskulatur zu Regenerieren ist auf das Vorhandensein von Stammzellen, den sogenannten Satellitenzellen, zurückzuführen. Diese befinden sich unter der Basallamina, die jede einzelne Muskelfaser umgibt. Diese Zellen können durch externe Stimuli wie Training oder Verletzung aktiviert werden. Nach der Aktivierung kommt es zum Eintritt in den Zellzyklus. Die Satellitenzellen proliferieren und bilden eine Vielzahl von Myoblasten, die während der Differenzierung mit beschädigten Muskelfasern fusionieren oder selbst neuen Muskelfasern bilden. Diese Prozesse werden von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren gesteuert.

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Bmp-Signalweges während der Muskelregeneration untersucht. Die detaillierte Analyse zeigte, dass *ex vivo* kultivierte Satellitenzellen bereits während der Aktivierung auf Bmp-Signale reagieren können. Zusätzlich konnte eine Stimulation der Satellitenzellen mit Bmps die Expression des Transkriptionsfaktors Pax7 während dieser Phase aufrechterhalten. Des Weiteren stellte sich heraus, dass Bmp-Signale die Satellitenzellen in einem aktiv proliferierenden Zustand halten. Im Gegensatz dazu verursachte die Inhibition der Bmp-Signale den Austritt der Myoblasten aus dem Zellzyklus, wodurch es zu einer verstärkten Differenzierung und der damit verbundenen Bildung von Myotuben kommt. Interessanterweise konnte die endogene Expression des Bmp-Inhibitors Chordin im Verlauf der Differenzierung in *ex vivo* Kulturen festgestellt werden.

Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass Bmp-Signale eine frühzeitige Differenzierung von Satellitenzellen verhindern, während die Inhibition der Bmp-Signale für den Übergang von der Proliferation in die Differenzierung benötigt wird. Um diese Funktion des Bmp-Signalweges während der Regeneration *in vivo* zu bestätigen, wurden die regenerierenden Muskeln von Mäusen untersucht, die ein standardisiertes Muskeltrauma erfahren hatten. Auch während der *in vivo* Regeneration konnte in der frühen Phase der Regeneration der aktivierte Bmp-Signalweg in den Satellitenzellen der regenerierenden Muskulatur nachgewiesen werden. In der späten Phase hingegen, in der die Myogenin Expression bereits abnahm, waren die intrazellulären Mediatoren des Bmp-Signalwegs kaum detektierbar. Die Analyse der Genexpression zeigte außerdem, dass in dieser späten

Phase der Muskelregeneration der Bmp-Inhibitor *Chordin* deutlich höher exprimiert war als in den frühen Stadien der Regeneration.

Basierend auf diesen Ergebnissen ergibt sich ein Modell, in dem der aktivierte Bmp-Signalweg während der frühen Phase der Regeneration die Proliferation der Myoblasten stimuliert und eine frühzeitige Differenzierung verhindert. Die intrinsische, zeitlich koordinierte Inhibition der Bmp-Signale während der späten Regeneration ermöglicht dann den Austritt der Myoblasten aus dem Zellzyklus und die Differenzierung in Muskelfasern.

7. Abstract

The capacity of muscle to grow or to regenerate after damage is provided by adult stem cells- so called satellite cells, which are located under the basement lamina of each myofiber. Upon activation satellite cells enter the cell cycle, proliferate and differentiate into myoblasts, which fuse to injured myofibers or form new fibers. These processes are tightly controlled by many growth factors.

In this study we investigated the role of Bmp-signaling during satellite cell differentiation. Detailed analysis revealed that satellite cells respond to Bmp signals during early stages of the activation process. Furthermore, Bmp-signaling seems to support Pax7 expression at early activation stages. Bmp signaling enhances the proliferation rate thereby preventing cell cycle exit of activated satellite cells. In contrast inhibition of Bmp-signaling promotes cell cycle exit leading to a reduced number of myonuclei and enhanced myotube formation. Interestingly, the Bmp inhibitor *Chordin* is upregulated during the differentiation process. To test if inhibition of Bmp-signaling supports the transition from proliferation to differentiation *in vivo* we analyzed muscle regeneration in a standardized injury mouse model. Similar to the *ex vivo* experiment we found Bmp-signaling activated in satellite cells at early stages of differentiation. At later stages, when *Myogenin* expression decreases in the trauma muscle and the intracellular mediators of Bmp-signals were hardly detectable we found *Chordin* expression upregulated.

Based on these data we propose a role for endogenous Bmp signals in expanding the pool of proliferating satellite cells and preventing premature terminal differentiation. A temporally coordinated, intrinsic inhibition of Bmp signals by Chordin will subsequently regulate the pace of the differentiation process.

8. Literaturverzeichnis

- Allen, R. E. and Boxhorn, L. K.** (1989). Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol*, **138**, 311-315.
- Allen, R. E. and Boxhorn, L. K.** (1987). Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. *Journal of Cellular Physiology*, **133**, 567-572.
- Allen, R. E. and Boxhorn, L. K.** (1989). Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*, **138**, 311-5.
- Allen, R. E., Sheehan, S. M., Taylor, R. G., Kendall, T. L., and Rice, G. M.** (1995). Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, **165**, 307-312.
- Amthor, H., Christ, B., and Patel, K.** (1999). A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)*, **126**, 1041-1053.
- Amthor, H., Otto, A., Vulin, A., Rochat, A., Dumonceaux, J., Garcia, L., Mouisel, E., Hourdé, C., Macharia, R., Friedrichs, M., et al.** (2009). Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 7479-7484.
- Anderson, J. E.** (2000). A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 1859-1874.
- Bakrania, P., Efthymiou, M., Klein, J. C., Salt, A., Bunyan, D. J., Wyatt, A., Ponting, C. P., Martin, A., Williams, S., Lindley, V., et al.** (2008). Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways. *Am. J. Hum. Genet*, **82**, 304-319.
- Barton, E. R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H. L.** (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J. Cell Biol*, **157**, 137-148.
- Beauchamp, J. R., Heslop, L., Yu, D. S., Tajbakhsh, S., Kelly, R. G., Wernig, A., Buckingham, M. E., Partridge, T. A., and Zammit, P. S.** (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biol*, **151**, 1221-1234

- Benezra, R., Davis, R. L., Lassar, A., Tapscott, S., Thayer, M., Lockshon, D., and Weintraub, H.** (1990). Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **599**, 1-11.
- Biressi, S., Molinaro, M., and Cossu, G.** (2007). Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev. Biol.*, **308**, 281-293.
- Bischoff, R.** (1986a). A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Dev. Biol.*, **115**, 140-147.
- Bischoff, R.** (1986b). Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Dev. Biol.*, **115**, 129-139.
- Bischoff, R.** (1975). Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. *Anat. Rec.*, **182**, 215-235.
- Blau, H. M. and Springer, M. L.** (1995). Muscle-mediated gene therapy. *N. Engl. J. Med.*, **333**, 1554-1556.
- Blau, H. M., Chiu, C. P., and Webster, C.** (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, **32**, 1171-80.
- Bogdanovich, S., Krag, T. O. B., Barton, E. R., Morris, L. D., Whittemore, L., Ahima, R. S., and Khurana, T. S.** (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, **420**, 418-421.
- Braun, T. and Arnold, H. H.** (1995). Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J.*, **14**, 1176-1186.
- Brent, A. E., Schweitzer, R., and Tabin, C. J.** (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell*, **113**, 235-248.
- Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., and Moore, K. J.** (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1189-1192.
- Chargé, S. B. P. and Rudnicki, M. A.** (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.*, **84**, 209-238.
- Christ, B., Jacob, H. J., and Jacob, M.** (1977). Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol.*, **150**, 171-186.
- Christ, B., Jacob, M., and Jacob, H. J.** (1983). On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. *Anat. Embryol.*, **166**, 87-101.
- Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., et al.** (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1397-1409.

- Clever, J. L., Sakai, Y., Wang, R. A., and Schneider, D. B.** (2010). Inefficient skeletal muscle repair in inhibitor of differentiation knockout mice suggests a crucial role for BMP signaling during adult muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*, **298**, C1087-99.
- Cohn, R. D., van Erp, C., Habashi, J. P., Soleimani, A. A., Klein, E. C., Lisi, M. T., Gamradt, M., ap Rhys, C. M., Holm, T. M., Loeys, B. L., et al.** (2007). Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- β -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med*, **13**, 204-210.
- Coleman, M. E., DeMayo, F., Yin, K. C., Lee, H. M., Geske, R., Montgomery, C., and Schwartz, R. J.** (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J. Biol. Chem*, **270**, 12109-12116.
- Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A., and Morgan, J. E.** (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, **122**, 289-301.
- Cornelison, D. D., Filla, M. S., Stanley, H. M., Rapraeger, A. C., and Olwin, B. B.** (2001). Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev. Biol*, **239**, 79-94.
- Cornelison, D. D.** (2008). Context matters: in vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity. *J Cell Biochem*, **105**, 663-9.
- Cornelison, D. D. and Wold, B. J.** (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*, **191**, 270-83.
- Cossu, G. and Mavilio, F.** (2000). Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J. Clin. Invest*, **105**, 1669-1674.
- Crisan, M., Casteilla, L., Lehr, L., Carmona, M., Paoloni-Giacobino, A., Yap, S., Sun, B., Léger, B., Logar, A., Pénicaud, L., et al.** (2008). A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle. *Stem Cells*, **26**, 2425-2433.
- d'Albis, A., Couteaux, R., Janmot, C., Roulet, A., and Mira, J. C.** (1988). Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur. J. Biochem*, **174**, 103-110.
- Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, **51**, 987-1000.

- De Robertis, E. M.** (2009). Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. *Mech. Dev*, **126**, 925-941.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B. G., Messina, G., Morosetti, R., et al.** (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol*, **9**, 255-267.
- Denetclaw, W. F., Christ, B., and Ordahl, C. P.** (1997). Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development*, **124**, 1601-1610.
- Derynck, R. and Feng, X. H.** (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1333**, F105-150.
- Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P., and Persani, L.** (2004). Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am. J. Hum. Genet*, **75**, 106-111.
- DiMario, J. and Strohman, R. C.** (1988). Satellite cells from dystrophic (mdx) mouse muscle are stimulated by fibroblast growth factor in vitro. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, **39**, 42-49.
- Doumit, M. E., Cook, D. R., and Merkel, R. A.** (1993). Fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin-like growth factors, and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells. *J. Cell. Physiol*, **157**, 326-332.
- Dube, J. L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K. M., Celeste, A. J., and Matzuk, M. M.** (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol. Endocrinol*, **12**, 1809-1817.
- Duprez, D. M., Coltey, M., Amthor, H., Brickell, P. M., and Tickle, C.** (1996). Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev. Biol*, **174**, 448-452.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K.** (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem*, **276**, 12477-12480.
- Enslen, H., Branchio, D. M., and Davis, R. J.** (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J*, **19**, 1301-1311.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F.** (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, **279**, 1528-1530.

- Florini, J. R., Ewton, D. Z., and Roof, S. L.** (1991). Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol. Endocrinol*, **5**, 718-724.
- Floss, T., Arnold, H. H., and Braun, T.** (1997). A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev*, **11**, 2040-51.
- Füchtbauer, E. M. and Westphal, H.** (1992). MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, **193**, 34-39.
- Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S.** (2007). Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells*, **25**, 2448-59.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Belmonte, J. C. I., and Choe, S.** (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*, **420**, 636-642.
- Grounds, M. D., Garrett, K. L., Lai, M. C., Wright, W. E., and Beilharz, M. W.** (1992). Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell and Tissue Research*, **267**, 99-104.
- Haldar, M., Karan, G., Tvrdik, P., and Capecchi, M. R.** (2008). Two cell lineages, myf5 and myf5-independent, participate in mouse skeletal myogenesis. *Dev. Cell*, **14**, 437-445.
- Harris, J. B. and Johnson, M. A.** (1978). Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, **5**, 587-600.
- Harris, J. B., Johnson, M. A., and Karlsson, E.** (1974). Proceedings: Histological and histochemical aspects of the effect of notexin on rat skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol*, **52**, 152P.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N., and Klein, W. H.** (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, **364**, 501-506.
- Heilig, R., Lemaire, C., Mandel, J. L., Dandolo, L., Amar, L., and Avner, P.** (1987). Localization of the region homologous to the Duchenne muscular dystrophy locus on the mouse X chromosome. *Nature*, **328**, 168-170.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., and Kunkel, L. M.** (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, **51**, 919-928.

- Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Rüther, U., and Nordheim, A. (1999). Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 19838-19845.
- Hua, H., Zhang, Y. Q., Dabernat, S., Kritzik, M., Dietz, D., Sterling, L., and Sarvetnick, N. (2006). BMP4 regulates pancreatic progenitor cell expansion through Id2. *J Biol Chem*, **281**, 13574-80.
- Huard, J., Acsadi, G., Jani, A., Massie, B., and Karpati, G. (1994). Gene transfer into skeletal muscles by isogenic myoblasts. *Hum. Gene Ther*, **5**, 949-958.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J., and Ten Dijke, P. (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur. J. Biochem*, **267**, 6954-6967.
- Kahane, N., Cinnamon, Y., and Kalcheim, C. (1998). The origin and fate of pioneer myotomal cells in the avian embryo. *Mech. Dev*, **74**, 59-73.
- Kan, L., Hu, M., Gomes, W. A., and Kessler, J. A. (2004). Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)-like phenotype. *The American Journal of Pathology*, **165**, 1107-1115.
- Kaplan, F. S., Le Merrer, M., Glaser, D. L., Pignolo, R. J., Goldsby, R., Kitterman, J. A., Groppe, J., and Shore, E. M. (2008). Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, **22**, 191-205.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*, **431**, 466-471.
- Kastner, S., Elias, M. C., Rivera, A. J., and Yablonka-Reuveni, Z. (2000). Gene Expression Patterns of the Fibroblast Growth Factors and Their Receptors During Myogenesis of Rat Satellite Cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **48**, 1079-1096.
- Katagiri, T., Akiyama, S., Namiki, M., Komaki, M., Yamaguchi, A., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. (1997). Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and myogenin. *Experimental Cell Research*, **230**, 342-351.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *The Journal of Cell Biology*, **127**, 1755-1766.

- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., and Wrana, J. L.** (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell*, **6**, 1365-1375.
- Keller, H. L., St Pierre Schneider, B., Eppihimer, L. A., and Cannon, J. G.** (1999). Association of IGF-I and IGF-II with myofiber regeneration in vivo. *Muscle Nerve*, **22**, 347-354.
- Knapp, J. R., Davie, J. K., Myer, A., Meadows, E., Olson, E. N., and Klein, W. H.** (2006). Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. *Development*, **133**, 601-610.
- Koenig, M., Monaco, A. P., and Kunkel, L. M.** (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, **53**, 219-228.
- Komaki, M., Asakura, A., Rudnicki, M. A., Sodek, J., and Cheifetz, S.** (2004). MyoD enhances BMP7-induced osteogenic differentiation of myogenic cell cultures. *Journal of Cell Science*, **117**, 1457-1468.
- Konigsberg, U. R., Lipton, B. H., and Konigsberg, I. R.** (1975). The regenerative response of single mature muscle fibers isolated in vitro. *Dev. Biol*, **45**, 260-275.
- Kreider, B. L., Benezra, R., Rovera, G., and Kadesch, T.** (1992). Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science*, **255**, 1700-2.
- Kuang, S., Chargé, S. B., Seale, P., Huh, M., and Rudnicki, M. A.** (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J. Cell Biol*, **172**, 103-113.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M. A.** (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, **129**, 999-1010.
- Kumar, D., Shadrach, J. L., Wagers, A. J., and Lassar, A. B.** (2009). Id3 is a direct transcriptional target of Pax7 in quiescent satellite cells. *Molecular Biology of the Cell*, **20**, 3170-3177.
- Lane, K. B., Machado, R. D., Pauciulo, M. W., Thomson, J. R., Phillips, J. A., Loyd, J. E., Nichols, W. C., and Trembath, R. C.** (2000). Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat. Genet*, **26**, 81-84.
- Lattanzi, L., Salvatori, G., Coletta, M., Sonnino, C., Cusella De Angelis, M. G., Gioglio, L., Murry, C. E., Kelly, R., Ferrari, G., Molinaro, M., et al.** (1998). High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. *J. Clin. Invest*, **101**, 2119-2128.

- Lefaucheur, J. P., Gjata, B., Lafont, H., and Sebille, A.** (1996). Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J. Neuroimmunol*, **70**, 37-44.
- Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R. S., and Nevins, J. R.** (1998). E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev*, **12**, 2120-2130.
- Lepper, C., Conway, S. J., and Fan, C.** (2009). Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature*, **460**, 627-631.
- L'honore, A., Rana, V., Arsic, N., Franckhauser, C., Lamb, N. J., and Fernandez, A.** (2007). Identification of a new hybrid serum response factor and myocyte enhancer factor 2-binding element in MyoD enhancer required for MyoD expression during myogenesis. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1992-2001.
- Lipton, B. H. and Schultz, E.** (1979). Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science*, **205**, 1292-1294.
- Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Massague, J., Rosa, J. L., and Ventura, F.** (2002). Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem*, **277**, 3176-85.
- Lounev, V. Y., Ramachandran, R., Wosczyzna, M. N., Yamamoto, M., Maidment, A. D. A., Shore, E. M., Glaser, D. L., Goldhamer, D. J., and Kaplan, F. S.** (2009). Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, **91**, 652-663.
- Massagué, J.** (1998a). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem*, **67**, 753-791.
- Massagué, J.** (1998b). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem*, **67**, 753-791.
- Mauro, A.** (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, **9**, 493-495.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M., and Lee, S. J.** (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, **387**, 83-90.
- Meadows, E., Cho, J. H., Flynn, J. M., and Klein, W. H.** (2008a). Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Dev Biol*, **322**, 406-14.

- Meadows, E., Cho, J. H., Flynn, J. M., and Klein, W. H.** (2008b). Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Dev Biol*, **322**, 406-14.
- Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., and Rudnicki, M. A.** (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev*, **10**, 1173-1183.
- Minasi, M. G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R., et al.** (2002). The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*, **129**, 2773-2783.
- Moss, F. P. and Leblond, C. P.** (1971). Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat. Rec*, **170**, 421-435.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol*, **155**, 335-350.
- Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., and Imamura, T.** (2003). Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2809-2817.
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., and Nabeshima, Y.** (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*, **364**, 532-535.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H., et al.** (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, **389**, 631-635.
- Nawrothki, R., Blake, D. J., and Davies, K. E.** (1996). The genetic basis of neuromuscular disorders. *Trends Genet*, **12**, 294-298.
- Otto, A., Collins-Hooper, H., and Patel, K.** (2009). The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *Journal of Anatomy*, **215**, 477-497.
- Partridge, T. A.** (1997). Tissue culture of skeletal muscle. *Methods Mol Biol*, **75**, 131-44.
- Patapoutian, A., Yoon, J. K., Miner, J. H., Wang, S., Stark, K., and Wold, B.** (1995). Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development*, **121**, 3347-3358.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.

- Philippou, A., Halapas, A., Maridaki, M., and Koutsilieris, M.** (2007). Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, **7**, 208-218.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E. M.** (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, **86**, 589-598.
- Rawls, A., Morris, J. H., Rudnicki, M., Braun, T., Arnold, H. H., Klein, W. H., and Olson, E. N.** (1995). Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.*, **172**, 37-50.
- Reznik, M.** (1969). Thymidine-3H uptake by satellite cells of regenerating skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **40**, 568-571.
- Rosenblatt, J. D., Lunt, A. I., Parry, D. J., and Partridge, T. A.** (1995). Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **31**, 773-9.
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., and Jaenisch, R.** (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, **75**, 1351-1359.
- Salvatori, G., Ferrari, G., Mezzogiorno, A., Servidei, S., Coletta, M., Tonali, P., Giavazzi, R., Cossu, G., and Mavilio, F.** (1993). Retroviral vector-mediated gene transfer into human primary myogenic cells leads to expression in muscle fibers in vivo. *Hum. Gene Ther.*, **4**, 713-723.
- Scata, K. A., Bernard, D. W., Fox, J., and Swain, J. L.** (1999). FGF receptor availability regulates skeletal myogenesis. *Exp. Cell Res.*, **250**, 10-21.
- Schmitz, D., Bangen, J., Herborn, C., Husain, B., Lendemans, S., Flohé, S., Metz, K., Schade, F., Taeger, G., Oberbeck, J., et al.** (2009). Isolated closed minor-muscle injury of the lower leg did not cause an obvious systemic immune response. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.*
- Schultz, E., Gibson, M. C., and Champion, T.** (1978). Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J. Exp. Zool.*, **206**, 451-456.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M. A.** (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, **102**, 777-786.
- Sheehan, S. M. and Allen, R. E.** (1999). Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol*, **181**, 499-506.

- Shim, J., Greenblatt, M. B., Xie, M., Schneider, M. D., Zou, W., Zhai, B., Gygi, S., and Glimcher, L. H.** (2009). TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage. *EMBO J*, **28**, 2028-2041.
- Shore, E. M., Xu, M., Feldman, G. J., Fenstermacher, D. A., Cho, T., Choi, I. H., Connor, J. M., Delai, P., Glaser, D. L., LeMerrer, M., et al.** (2006). A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nature Genetics*, **38**, 525-527.
- Snow, M. H.** (1977). Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat. Rec*, **188**, 201-217.
- Stockdale, F. E.** (1992). Myogenic cell lineages. *Dev. Biol*, **154**, 284-298.
- Stockdale, F. E., Nikovits, W., and Christ, B.** (2000). Molecular and cellular biology of avian somite development. *Dev. Dyn*, **219**, 304-321.
- Tajbakhsh, S., Bober, E., Babinet, C., Pournin, S., Arnold, H., and Buckingham, M.** (1996). Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Dev. Dyn*, **206**, 291-300.
- Tallquist, M. D., Weismann, K. E., Hellström, M., and Soriano, P.** (2000). Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development. *Development*, **127**, 5059-5070.
- Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Cheng, P. F., Weintraub, H., and Lassar, A. B.** (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science*, **242**, 405-411.
- Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J., Halevy, O., and Allen, R. E.** (1998). HGF/SF Is Present in Normal Adult Skeletal Muscle and Is Capable of Activating Satellite Cells*1. *Developmental Biology*, **194**, 114-128.
- Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., and Allen, R. E.** (2002). Release of Hepatocyte Growth Factor from Mechanically Stretched Skeletal Muscle Satellite Cells and Role of pH and Nitric Oxide. *Molecular Biology of the Cell*, **13**, 2909-2918.
- Teboul, L., Gaillard, D., Staccini, L., Inadera, H., Amri, E. Z., and Grimaldi, P. A.** (1995). Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J. Biol. Chem*, **270**, 28183-28187.
- Ten Broek, R. W., Grefte, S., and Von den Hoff, J. W.** (2010). Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Physiol*, **224**, 7-16.

- Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M.** (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, **81**, 801-9.
- Tidball, J. G.** (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **288**, R345-353.
- Turk, R., Sterrenburg, E., de Meijer, E. J., van Ommen, G. B., den Dunnen, J. T., and 't Hoen, P. A. C.** (2005). Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics*, **6**, 98.
- Urist, M. R.** (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y.)*, **150**, 893-899.
- Urist, M. R. and Strates, B. S.** (1971). Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, **50**, 1392-406.
- Wada, M. R., Inagawa-Ogashiwa, M., Shimizu, S., Yasumoto, S., and Hashimoto, N.** (2002). Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 2987-2995.
- Wang, J. and Walsh, K.** (1996). Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science*, **273**, 359-61.
- Webster, C. and Blau, H. M.** (1990). Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat. Cell Mol. Genet*, **16**, 557-565.
- Weintraub, H., Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Adam, M. A., Lassar, A. B., and Miller, A. D.** (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5434-5438.
- Williams, B. A. and Ordahl, C. P.** (1997). Emergence of determined myotome precursor cells in the somite. *Development*, **124**, 4983-4997.
- Wozniak, A. C. and Anderson, J. E.** (2007). Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, **236**, 240-250.
- Yablonka-Reuveni, Z. and Rivera, A. J.** (1994). Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Developmental Biology*, **164**, 588-603.
- Yablonka-Reuveni, Z. and Paterson, B. M.** (2001). MyoD and Myogenin Expression Patterns in Cultures of Fetal and Adult Chicken Myoblasts. *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 455-462.

- Yablonka-Reuveni, Z., Seger, R., and Rivera, A. J.** (1999). Fibroblast Growth Factor Promotes Recruitment of Skeletal Muscle Satellite Cells in Young and Old Rats. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **47**, 23-42.
- Yaffe, D. and Saxel, O.** (1977). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation*, **7**, 159-66.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A.** (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, **115**, 281-92.
- Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K., and Nabeshima, Y.** (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *Journal of Cell Science*, **111 (Pt 6)**, 769-779.
- Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A., and Beauchamp, J. R.** (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *The Journal of Cell Biology*, **166**, 347-357.
- Zammit, P. S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A. P., Collins, C. A., Partridge, T. A., and Beauchamp, J. R.** (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*, **119**, 1824-1832.
- Zebedee, Z. and Hara, E.** (2001). Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene*, **20**, 8317-25.
- Zhang, W., Behringer, R. R., and Olson, E. N.** (1995). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev*, **9**, 1388-1399.
- Zhao, P., Caretti, G., Mitchell, S., McKeefhan, W. L., Boskey, A. L., Pachman, L. M., Sartorelli, V., and Hoffman, E. P.** (2006). Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway. *J. Biol. Chem*, **281**, 429-438.
- Zhou, X. P., Woodford-Richens, K., Lehtonen, R., Kurose, K., Aldred, M., Hampel, H., Launonen, V., Virta, S., Pilarski, R., Salovaara, R., et al.** (2001). Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am. J. Hum. Genet*, **69**, 704-711.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Vortkamp, die mir durch die Aufnahme in Ihr Labor und die Übernahme in Ihre Arbeitsgruppe die Erstellung meiner Doktorarbeit ermöglicht hat. Ich bedanke mich für die Betreuung, Unterstützung und hilfreiche Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Dr. Dörthe Kesper, Dr. Tabea Dierker und Dr. Stefanie Groß für das Korrekturlesen des Manuskripts, sowie bei Dr. Manuela Wülling für die Hilfestellung im Labor und die Unterstützung beim Anfertigen der Publikation.

Ich danke den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Vortkamp für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Bei Prof. Dr. Daniel Hoffmann möchte ich mich für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung und die scheinbar grenzenlose Geduld bedanken.

Bei den Mitgliedern der AG "Chirurgische Forschung", besonders Florian Wirsdörfer, möchte ich mich für die Bereitstellung der Traumamuskeln bedanken.

Ich danke Dr. Helge Amthor und Prof. Dr. Thomas Voit für die Bereitstellung des Themas und die Anstellung an der Kinderklinik.

Meiner Familie möchte ich danken, da sie mich in allen Lebenslagen immer unterstützte und viel Vertrauen in mich setzte.

Ein besonderes Dankeschön geht an Patrick Kurth, der mich während der gesamten Doktorarbeit immer wieder motivierte und unterstützte. Für die viele Geduld, das Verständnis sowie die großartige Hilfe möchte ich mich herzlich bedanken.

Publikationen

Friedrichs M, Larralde O, Skutella T, Theil T.

Lamination of the cerebral cortex is disturbed in Gli3 mutant mice.

Dev Biol 2008 Jun 1;318(1):203-14

Amthor H, Otto A, Rochat A, Dumonceaux J, Garcia L, Mouisel E, Houdé C, Macharia R, Friedrichs M, Relaix F, Zammit PS, Matsakas A, Patel K, Partridge T.

Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity.

Proc Natl Acad Sci USA. 2009 May 5;106(18):7479-84.

Friedrichs M, Wirsdörfer F, Flohé S, Wuelling M, Vortkamp A.

Bmp-signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants.

BMC Cell Biol. 2011 June 6;12:26

Kongressbeiträge (Poster)

- | | |
|---------|--|
| 11/2007 | 6. Forschungstag der medizinischen Fakultät,
Universitätsklinikum Essen
<u>M. Friedrichs</u> , H. Amthor and A. Vortkamp
<i>Bmp-signaling during satellite cell activity</i> |
| 09/2009 | Annual Retreat of the DFG Graduate Training Program
"Transcription, chromatin structure and DNA repair in
development and differentiation", Dormagen-Zons
<u>M. Friedrichs</u> , F. Wirsdörfer, S. Flohé, H. Amthor and A.
Vortkamp
<i>Bmp-signaling during muscle regeneration</i> |
| 10/2009 | Myores annual congress, St. Julian's, Malta
<u>M. Friedrichs</u> , F. Wirsdörfer, S. Flohé, H. Amthor and A.
Vortkamp
<i>Bmp-signaling during muscle regeneration</i> |

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchung des Bmp-Signalweges während der Muskelregeneration“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Melanie Friedrichs befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

(Prof. Dr. Andrea Vortkamp)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

(Melanie Friedrichs)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

(Melanie Friedrichs)